



IHMISSOLUPOHJAISEN SYDÄN- MALLIN ALUSTAPINNOITUKSET ERI MATERIAALEILLA

Sanna-Kaisa Vasaramäki

Opinnäytetyö
Toukokuu 2014
Laboratorioalan koulutusohjelma

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

VASARAMÄKI, SANNA-KAISA:

Ihmissolupohjaisen sydänmallin alustapinnoitukset eri materiaaleilla

Opinnäytetyö 63 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Toukokuu 2014

Eläinkokeettomien testausmenetelmien kehitystä ja käyttöönottoa on pyritty viime vuosina lisäämään kansainvälisesti. EU edellyttää jäsenmaidensa käyttävän vaihtoehtoisia testausmenetelmiä aina kun se on mahdollista. Voimaantulleista lakimuutoksista huolimatta eläinkokeiden määrä on kasvussa, sillä validoituja testausmenetelmiä on olemassa toistaiseksi vain muutamia. Ihmissolupohjaiset testimenetelmät voivat tarjota tulevaisuudessa eläinkokeita eettisemmän, nopeamman ja luotettavan vaihtoehdon tutkittaessa yhdisteiden vaikutusta ihmiseen. Sydänmalli koostuu verisuonirakenteita muodostavista soluista sekä sydänlihassoluista. Ihmissolupohjaisen sydänmallin kehitysprojektin pyrkimyksenä on eläinkokein suoritettavien toksisuustestien korvaaminen *in vitro* -testillä.

Sydänsolumallin kehittämisessä haasteena on ollut solujen irtoaminen sydänmittauksia varten kehitetyiltä kasvatusalustoilta ennen tarpeeksi pitkän viljelyajan saavuttamista. Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia erilaisia pinnoitusmateriaaleja ja löytää niistä solujen kiinnittymistä ja rakenteiden muodostumista edistävä vaihtoehto, joka soveltuisi parhaiten sydänmallin kehitysprojektin tarkoituksiin. Lisäksi tavoitteena oli tutkia, olisiko happiplasmakäsittelyllä solumallin kiinnipysymistä edistävä vaikutus.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata kaupallisia fibronektiini-, laminiini- ja kollageeni IV -pinnoitemateriaaleja, sekä itse valmistettuja gelatiini-, polyetyleenimini- ja nitroselluloosapinnoitteita eri viljelyalustaformaateilla. Sydänmallin toiminnallisia mittauksia varten kehitetyille kasvatusalustoille tehtiin happiplasmakäsittely. Tuloksia arvioitiin sydänlihassolujen morfologiassa ja verisuonirakenteissa tapahtuvia muutoksia seuraamalla immunovärjäyksen, sekä sydänlihassolujen sykinän tiheyttä ja synkronisuutta määrittävin mittauksin.

Tutkimuksessa käytetyistä pinnoitusmateriaaleista nitroselluloosa- ja polyetyleeniminipinnoitteet toimivat huonosti. Parhaiten toimi fibronektiini, mutta erot fibronektiinin ja muiden pinnoitusyhdisteiden välillä eivät olleet suuria. Happiplasmakäsittelyllä oli lievästi sydänmallin kiinnipysymistä parantava vaikutus, mutta vaikutus oli lyhytkestoinen. Tutkimuksessa havaittiin verisuonirakenteilla olevan selkeä vaikutus sydänlihassolujen morfologiaan.

Asiasanat: vaihtoehtoiset testausmenetelmät, sydänmalli, pinnoitteet, *in vitro* -testit, happiplasmakäsittely

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

VASARAMÄKI, SANNA-KAISA:

Coating experiments on the human-cell-based cardiovascular model

Bachelor's thesis 63 pages, appendices 3 pages
May 2014

The studies and the use of methods to replace animal testing have been internationally increasing in the past years. The EU requires its member countries to use alternative testing methods whenever it is possible. Regardless of the law, the number of tests performed on animals is on the rise, as validated testing methods exist so far only a few. Human-cell-based testing methods may offer a more ethical, reliable and faster alternative for the animal experiments in the future. *In vitro* cardiovascular construct is based on co-culture of vascular-like structures and human cardiomyocytes. The aim of the research on the human-cell-based cardiovascular model is to replace toxicity tests performed on animals with *in vitro* tests. One of the challenges in cardiovascular construct has been achieving sufficiently long culturing periods before the cells start to detach.

The objective of this Bachelor's thesis was to study different methods to increase the adherence of the cells of cardiovascular construct. Effects of the treatments on vascular-like structures and morphology of cardiomyocytes were also studied. The purpose of the study was to test several coating materials such as fibronectin, laminin, collagen (type IV), gelatin, polyethylene imine and nitrocellulose. An effect of an oxygen plasma treatment was also tested. The results of morphology, immunostaining and micro electrode array recordings were used when testing products.

Fibronectin was the most promising coating material, but the differences between fibronectin, laminin and type IV collagen were only slightly significant. Polyethylene imine and nitrocellulose proved not to be applicable coating material for the cardiovascular construct. The oxygen plasma treatment had a slightly improving effect on the cell construct attachment. The findings indicated that the vascular-like structures affect the morphology of cardiomyocytes.

Key words: alternative testing methods, *in vitro* cardiovascular construct, coating materials, human cardiomyocytes, oxygen plasma treatment

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	8
2	KIRJALLISUUSKATSAUS.....	9
2.1	Verisuonten muodostus.....	9
2.2	Sydämen rakenne ja toiminta.....	11
2.3	Vaihtoehtoiset menetelmät	13
2.4	Hyvä laboratoriokäytäntö (GLP)	14
2.5	Tutkimussovellukset	15
2.5.1	Angiogeneesimalli.....	15
2.5.2	Sydänmalli	15
2.6	Ihmissolumallin rakentaminen.....	17
2.6.1	Angiogeneesimallin solut.....	18
2.6.2	Kantasolut	19
2.6.3	Alkion kantasolut	19
2.6.4	Indusoidut pluripotentit kantasolut	20
2.7	Soluviljely	20
2.7.1	Solujen kiinnittyminen	21
2.7.2	Pinnoitusmateriaalit.....	22
2.8	Micro electrode array (MEA) -kasvatusalustat.....	23
2.8.1	Happiplasmakäsittely	25
2.8.2	MEA-mittaukset.....	26
2.9	Immunovärjäys	27
3	TYÖN SUORITUS	28
3.1	Soluviljelyolosuhteet	28
3.1.1	Solujen alkuperä.....	28
3.1.2	Solujen käsittely	29
3.1.3	Angiogeneesimallin rakentaminen.....	30
3.1.4	Sydänlihassolujen siirrostus	32
3.2	Pinnoituskokeet.....	35
3.2.1	Pinnoitemateriaalien valmistus	36
3.2.2	Alustojen pinnoituskäsittely.....	37
3.3	MEA-mittaukset.....	39
3.4	Immunofluoresenssivärjäykset	39
4	TYÖN TULOKSET	42
4.1	Sydänlihassolujen morfologia.....	42
4.2	Verisuonten muodostus.....	45
4.3	Sydänmallin kiinnittyminen.....	48

4.3.1	Angiogeneesimalli ennen sydänlihassolujen siirrostusta	48
4.3.2	hESC-sydänlihassolut	49
4.3.3	iPS-sydänlihassolut	49
4.3.4	Solumäärän vaikutus	49
4.4	Micro electrode array -mittaukset	50
5	POHDINTA.....	52
	LÄHTEET.....	56
	LIITTEET	61
	Liite 1. Mediumien valmistusohjeet	61
	Liite 2. Immunovärjäysliuosten valmistusohjeet.....	63

ERITYISSANASTO

Adherentti solu	solu, joka tarvitsee kasvaakseen pinnan johon kiinnittyä
Angiogeneesi	verisuonten uudismuodostuminen
Angiopoietiini	angiogeneesikasvutekijä
Autokriininen säätely	säätelymekanismi, jossa solun tuottamat yhdisteet vaikuttavat sen omaan toimintaan
EKG	elektrokardiogrammi, sydänsähkökäyrä
Endoteelisolu	verisuonten sisimmän kerroksen muodostava solu
ESC	(Embryonic Stem Cell), alkion kantasolu
FGF	(Fibroblast Growth Factor), fibroblastikasvutekijä
Fibroblasti	sidekudoksen solutyyppi
Fibronektiini	glykoproteiini
FICAM	(The Finnish Centre For Alternative Methods), vaihtoehtomenetelmäkeskus
Fiksaus	Solujen kiinnittäminen kasvatusalustaan ennen värjäystä
Gelatiini	proteiineista koostuva vesiliukoinen seos
GLP	(Good Laboratory Practice), hyvä laboratoriokäytäntö
hASC	(Human Adipose Stromal Cell), ihmisperäinen rasvakudoksesta eristetty stroomasolu
HGF	(Hepatocyte Growth Factor), hepatosyyttinen kasvutekijä, indusoi angiogeneesiä
hESC	(Human Embryonic Stem Cell), ihmisperäisen alkion kantasolu
HUVEC	(Human Umbilical Vein Endothelial Cell), ihmisen napanuorasta eristetty endoteelisolu
<i>in vitro</i>	elävän organismin ulkopuolella suoritettu testi
<i>in vivo</i>	elävässä organismissa suoritettu testi
iPS-solu	(Induced Pluripotent Stem cell), uudelleenohjelmoitu kantasolu
Kantasolu	solu, joka voi jakaantua rajattomasti säilyttäen kykynsä erilaistua miksi tahansa solutyyppiä
Kardiomyosyytti	sydänlihassolu
Kollageeni IV	tyvikalvon proteiini

Laminiini	glykoproteiini
Makrofagi	Immuunijärjestelmän solu
MEA	(Microelectrode Array), kasvatusalusta jolla voidaan tehdä sydänlihassolujen toiminnallisia mittauksia
Morfologia	solun rakenne ja muoto
Parakriininen säätely	solujen välisen viestinnän mekanismi, jossa yhdisteen vaikutus kohdistuu lähellä sijaitseviin soluihin
Perisytytti	hiusverisuonten uloimman kerroksen solutyyppi
Stroomasolu	sidekudoksen solu
VEGF	(Vascular Endothelial Growth Factor), endoteelisoluja aktivoiva kasvutekijä

1 JOHDANTO

Eläinkokeettomien tutkimusmenetelmien käyttöä edellyttävien EU-säädöksen voimaantulosta huolimatta koe-eläinten käyttö on viime vuosina lisääntynyt Suomessa (Länsihallitus 2014, Koe-eläinten käyttö Suomessa). Validoitujen testimenetelmien vähäisyyden vuoksi yhdisteiden täysin eläinkokeeton testaus on toistaiseksi mahdotonta. Yleisesti pyrkimyksenä on ollut sellaisten luotettavien vaihtoehtoisten menetelmien kehittäminen, joilla voitaisiin korvata ihmiseen kohdistuvien vaikutuksien tutkiminen. Erityisen suuri tarve olisi kehittää vaihtoehtoisia testimenetelmiä suuria koe-eläinmääriä vaativien ja kovaa kärsimystä aiheuttavien eläinkokeiden korvaamiseksi.

Opinnäytetyö tehtiin FICAM:lle (The Finnish Centre for Alternative Methods), joka on vaihtoehtoisten eläinkokeettomien testimenetelmien asiantuntijakeskus Tampereen yliopiston lääketieteellisessä yksikössä. Opinnäytetyö tehtiin osana FICAM:n sydänmallitestin kehitysprojektia. Opinnäytetyön ohjaajana toimi tutkija Hanna Vuorenpää ja opettajaohjaajana toimi Jaana Renko.

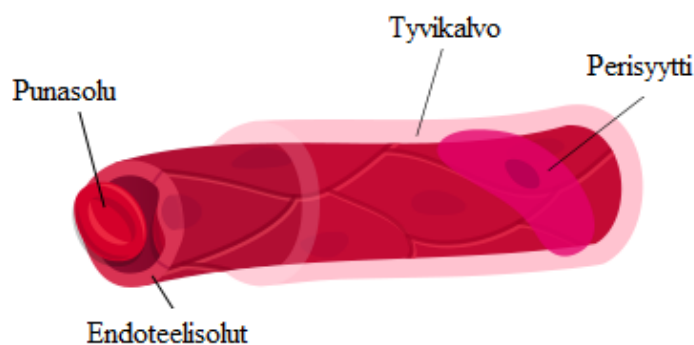
Sydänmallitutkimuksen pyrkimyksenä on kehittää ihmissolupohjainen solumalli toksikologisten ja perusbiologisten tutkimusten tarpeisiin korvaamaan koe-eläinten käyttöä. Sydänsolumalli koostuu kolmenlaisista soluista: strooma-, endoteeli- ja sydänlihassoluista. Sydänsolumallin kehittämisessä ongelmana on ollut solujen irtoaminen kasvatusalustoiltaan ennen tarpeeksi pitkän viljelyajan saavuttamista, jolloin esimerkiksi lääkeainetestauksia ei voida toteuttaa. Solut alkavat irrota yleensä 3 – 6 päivän jälkeen sydänlihassolujen siirrostamisesta.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tutkia, onko eri pinnoitemateriaaleilla ja kasvatusalustojen happiplasmakäsittelyllä vaikutusta solumallin kiinnipysymiseen, verisuonirakenteiden muodostumiseen ja sydänlihassolujen morfologiaan. Opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä sydänlihassolujen toiminnallisia mittauksia varten kehitetyille kasvatusalustoille happiplasmakäsittely ja testata kaupallisia fibronectiini-, lamiini- ja kollageeni IV -pinnoitemateriaaleja sekä itse valmistettuja gelatiini-, polyetyleenimini- ja nitroselluloosapinnoitteita eri viljelyalustaformaateilla. Tuloksia arvioidaan immunsytovärväysten ja sydänlihassolujen sähköistä aktiivisuutta määrittävien mittausten avulla.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Verisuonten muodostus

Angiogeneesi, eli verisuonten kasvu ja uudismuodostuminen kudosten kehittyessä ja haavojen parantuessa, on koko yksilön eliniän jatkuva monivaiheinen prosessi. Kaikki aineenvaihdunnallisesti aktiiviset kudokset ovat vähintään 200 µm päässä verisuoniverkostosta joiden kautta ravinteet ja kuona-aineet diffundoituvat kudoksiin ja kudoksista pois. (Hoeben ym. 2004, 549) Kapillaarit eli hiusverisuonet ovat pienimpiä verisuonia. Ne ovat halkaisijaltaan samaa kokoluokkaa kuin punasolut. Hiusverisuonet koostuvat yhdestä endoteelisolukerroksesta, jota ympäröi tyvikalvo (kuva 1). Tyvikalvon yhteydessä esiintyy perisyyttejä. Perisyytit ovat verisuonten yhteydessä esiintyviä supistumiskykyisiä soluja. (Ross & Pawlina 2006, 380–381.)



KUVA 1. Hiusverisuonen kaaviorakenne (Kuva: Wikimedia Commons 2013a, muokattu).

Angiogeneesi saa alkunsa kun sytokiiniin aktivoimat endoteelisolut alkavat jakautua, ryhmittäytyä ja erilaistua. Angiogeneesiin vaikuttavat useat kasvutekijät, jotka kuuluvat sytokiiniin ryhmään. (Beilmann, Birk, & Lenter 2004, 178–179.) Termi sytokiini sisältää laajan ryhmän solujen erittämiä pieniä proteiineja, jotka vaikuttavat muiden solujen toimintaan (Lackie 2010, 138).

Hapenpuutteen indusoimassa angiogeneesissä merkittävin rooli on verisuonten endoteelisoluja indusoivalla kasvutekijällä VEGF:llä (vascular endothelial growth factor). Muita angiogeneesin käynnistymiseen yhdistettyjä kasvutekijöitä ovat hepatosyyttikasvutekijä (HGF, hepatocyte growth factor), fibroblastikasvutekijä (FGF, fibroblast growth

factor) ja askorbiinihappo. Kasvutekijöiden vaikutus välittyy endoteelisoluihin tyrosiinikinaasi-tyyppisten reseptorien välityksellä. Tyrosiinikinaasireseptoreissa on solun ulkoinen osa, johon kasvutekijä sitoutuu, solukalvon läpäisevä osa sekä solun sisällä oleva osa, joka aktivoituu kasvutekijän vaikutuksesta. Tyrosiinikinaasireseptorin aktivoituminen saa aikaan sitoutumispaikkojen muodostumisen viestintäketjussa oleville proteiineille. Tyrosiinikinaasi vaikuttaa solunsisäisiin viestintäketjuihin fosforyloimalla itseensä sitoutuneiden säätelyproteiinien tyrosiini-aminohappoja, mikä saa aikaan näiden proteiinien aktivoitumisen. Tämä monivaiheinen viestintäketju käynnistää lopulta angiogeneesin kannalta olennaisten geenien ekspression. (Cross & Claesson-Welsh 2001, 202–203; Beilmann ym. 2004, 178; Adair & Montani 2010, 20;)

Angiogeneesin käynnistymiselle on luonteenomaista endoteelisoluista muodostuvat versomaiset rakenteet, jotka yleensä kasvavat angiogeneesiä stimuloivaa kasvutekijää, VEGF:ä kohti (Adair & Montani 2010, 20). VEGF kasvattaa verisuonirakenteiden pinta-alaa, pituutta ja haarautumiskohtien lukumäärää, kun taas HGF vaikuttaa spesifisesti ainoastaan pinta-alan kasvuun. Yhdessä näillä sytokiineilla on toisiaan vahvistava vaikutus verisuonien pinta-alan kasvun suhteen. (Beilmann ym. 2004, 180–181; Zhou ym. 2004, 4699–4702.)

Luonnollisessa ympäristössään endoteelisolujen aktivoitumiseen ja aineenvaihduntaan vaikuttavat kasvu ympäristön muut solut ja soluväliaineen, eli solujen välisen tilan, sisältämät yhdisteet. Soluväliaine koostuu muun muassa kuitumaisista proteiineista, kuten kollageenista ja elastiinista, sekä glykosaminoglykaaneista ja viestejä välittävistä kasvutekijöistä. (Adair & Montani 2010) Tukikudoksessa runsaasti esiintyvät fibroblastit ja rasvakudoksen stroomasolut tuottavat soluväliaineeseen monia angiogeneesin kannalta tärkeitä yhdisteitä. Stroomasolujen erittämiä sytokiineja ovat muun muassa VEGF, HGF ja angiopoietini. Fibroblasteja ja stroomasoluja käytetäänkin usein angiogeneesimalleissa yhdessä endoteelisolujen kanssa. (Rehman ym. 2004, 4699–4702; Beilmann ym. 2004, 178–185.)

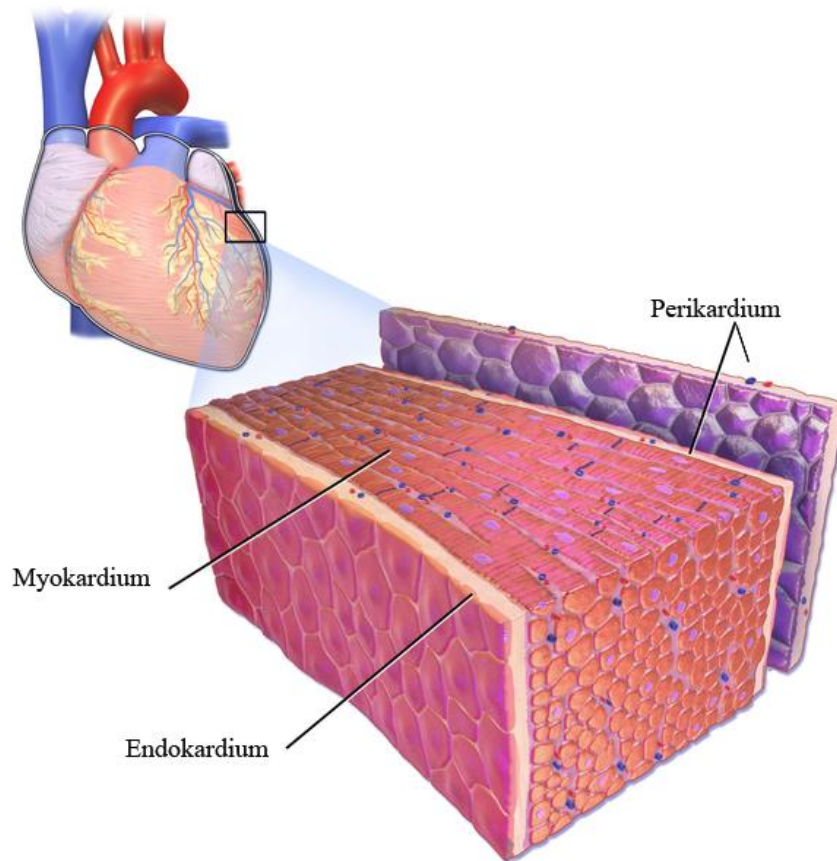
Verisuonten kypsyessä suonten yhteyteen erilaistuu sileitä lihassoluja ja tyvikalvon soluja, jotka muodostavat verisuonien rakenteita tukevan tukikudoksen. Stroomasolut edesauttavat varhaisten suonirakenteiden kypsymistä erilaistumalla verkostoa tukeviksi rakenteiksi, joilla on perisytytti- ja lihassolujen kaltaisia ominaisuuksia. (Sarkanen ym. 2012, 385–397.)

2.2 Sydämen rakenne ja toiminta

Nisäkkään sydän on useista eri solutyypeistä koostuva ontto lihas, joka kykenee itsenäiseen supistustoimintaan. Sydämen ulkopintaa ja sydäimestä lähteviä suuria verisuonia ympäröi perikardiumiksi kutsuttu kahden kalvon muodostama pussimainen rakenne. Sydämen sykettä säätelevät oikeassa eteiskammiossa sijaitsevat solmukesolut, jotka aktivoituessaan aiheuttavat sähköisen impulssin aallon, eli aktiopotentiaalin. Sähköiset impulssit kulkeutuvat myokardiumin eli sydänlihaskudoksen kautta, joka koostuu toisiinsa erityisten liitoskohtien eli kytkeytyvien (intercalated disks) avulla yhteydessä olevien kardiomyosyyttien muodostamasta verkostosta. Verkoston sydänlihassolut saavat supistuessaan aikaan veren virtauksen. Sydämen sisin osa, endokardium, on endoteelisolujen muodostama limakalvo, joka ympäröi sydäneteisiä ja -kammioita. (Nag 1979, 41; Laizzo 2009, 65, 125.) Kuvassa 2 on havainnollistettu sydämen rakenteita.

Sydän koostuu suurimmaksi osaksi muista kuin sydänlihassoluista eli kardiomyosyyteistä (CM), mutta yksittäisenä solutyypinä kardiomyosyyttien määrä on suurin. Kardiomyosyyttejä sydämessä on noin 30–35 %. Loput 65–70 % ovat endoteelisoluja (EC), fibroblasteja, perisyyttejä, sileitä lihassoluja ja makrofageja. (Nag 1979, 41.) Kardiomyosyytit poikkeavat muista lihassoluista: Ne haarautuvat muodostaen keskenään tiheän soluverkoston, ja toisin kuin muissa lihassoluissa, sydänlihassolussa on vain yksi tuma. (Laizzo 2009, 65, 125.) Kardiomyosyytit voidaan jakaa tehtävänsä ja sijaintinsa perusteella kolmeen ryhmään. Kammioiden ja eteisten kardiomyosyytit saavat supistuessaan aikaan veren virtauksen. Nämä kaksi kardiomyosyyttityyppiä ovat elektrofysiologilta ominaisuuksiltaan samankaltaisia, mutta eroavat morfologisesti toisistaan. Eteisen kardiomyosyytit ovat muodoltaan pidempiä ja kapeampia kuin sydänkammion kardiomyosyytit. Lisäksi ne toimivat viestejä välittävinä soluina erittämällä verisuonia laajentavaa hormonia. Kolmannen ryhmän muodostavat solmukkeen tahdistinsolut, jotka aikaansaavat sähköisen impulssin ja sen leviämisen sydämen eri osiin. (Newman & Severs 1996, 134–140, Seversin 1996, 196 mukaan.)

Kardiomyosyytit menettävät kykynsä jakautua erilaistuttuaan kypsiksi kardiomyosyyteiksi, minkä vuoksi sydänlihaskudoksen on aikaisemmin ajateltu olevan täysin kykenemätön uusiutumaan. Kuitenkin radiohiiliajoitusmenetelmällä tehdyt kokeet ovat osoittaneet, että keskimääräisen ihmiseliniän aikana hieman alle 50 % kardiomyosyyteistä korvautuu uusilla kardiomyosyyteillä. (Bergmann ym. 2009, 98.)



KUVA 2. Sydänekudoksen rakenteet (Kuva: Wikimedia Commons 2013b, muokattu).

Kapillaarit pitävät yllä kardiomyosyyttien aineenvaihduntaa. Yhdisteiden kyky kulkeutua diffuusion avulla solusta soluun on rajallinen, joten kardiomyosyyttien ja kapillaarien endoteelisolujen välinen etäisyys on sydämen toiminnan kannalta merkittävä tekijä. Ratkaiseva on myös sydän- ja endoteelisolujen määrien välinen suhdeluku. Molemmat tekijät vaihtelevat eri eläinlajien kesken. (Brutsaert 2003, 62.)

Kardiomyosyyttejä esiintyy enimmäkseen sydämen keskisuurten verisuonien seinämissä. Suurilla nisäkkäillä kuten ihmisellä kardiomyosyyttien ja endoteelisolujen välinen etäisyys on vähimmillään 50 μm :iä. Sydänlihaksen endoteelisolut voidaan jaotella niiden sijainnin perusteella kahteen toisistaan poikkeavaan ryhmään, sydänlihaksen kapillaarien endoteelisoluihin ja endokardiumin kapillaarien endoteelisoluihin. Endokardiumin ja sydänlihaksen verisuoniston endoteelisolut eroavat toisistaan morfologisesti sekä toiminnallisesti, vaikkakin niillä on kardiomyosyytteihin samankaltainen vaikutus. Molemmat endoteelisolutyypit vaikuttavat kardiomyosyyttien metaboliaan, kasvuun sekä toiminnan ja rytmin säätelyyn auto- ja parakriinisen säätelyn välityksellä. Säätely tapahtuu yhdisteiden, kuten VEGF, angiopoietiini ja typpioksidi, välityksellä. Endo-

teelisolut pitävät yllä kardiomyosyyttien toiminnallisesti oikeanlaista fenotyyppiä, eli ilmiä, ja vaikuttavat solujen uudistumiskykyyn. Endoteelisolut vaikuttavat myös sydänverisuonien homeostasiaan säätelemällä sydänverisuonien läpäisevyyttä ja suonien kokoa vastaamaan kulloistakin tarvetta. (Brutsaert 2003, 62–65.)

2.3 Vaihtoehtoiset menetelmät

Koe-eläinten suojelua koskeva lakiuudistus sekä sitä kaksi tarkentavaa asetusta tulivat voimaan Suomessa elokuussa 2013. Direktiivin (2010/63/EU) 4. artiklan mukaan jäsenvaltioiden on varmistettava, että koe-eläinten sijasta käytetään tieteellisesti luotettavaa menetelmää tai testausstrategiaa, johon ei liity elävien eläinten käyttöä aina kun se on mahdollista. Uudistuksen myötä pyritään edistämään niin kutsuttua 3R-periaatetta (replacement, reduction, refinement), mikä tarkoittaa, että jäsenvaltioiden tulisi välttää koe-eläinten käyttöä sekä sovelletussa että perustutkimuksessa ja opetuksessa aina kun se on mahdollista. Mikäli eläimiä on käytettävä, metodeista on valittava inhimillisin ja vähiten eläimiä edellyttävä vaihtoehto.

Huolimatta eläinkokeettomia vaihtoehtojen käyttöä edellyttävistä säädöksistä koe-eläinten käyttö ei ole vähentynyt Suomessa (Lääninhallitus 2014, Koe-eläinten käyttö Suomessa). Koe-eläimiä käytetään, koska validoituja ihmissolupohjaisia testimenetelmiä on olemassa toistaiseksi vain muutamia. Jotta menetelmä voidaan validoida, sen tulee todistetusti täyttää sille asetetut kriteerit. Tällöin menetelmä toimii tarkoituksensa mukaisesti samalla tavalla riippumatta suorittajasta, toistokerrasta ja laboratoriosta. (Hyvän laboratoriokäytännön noudattamista koskeva direktiivi, 2004/10/EY.)

Validoitujen *in vitro* -testimenetelmien käyttö on perusteltua, jos testi ennustaa yhdisteen vaikutuksia ihmisessä yhtä luotettavasti tai luotettavammin kuin eläinmallit ja eläinsolumallit. Vaikka eläintestit antavat monipuolisesti tietoa yhdisteen vaikutuksesta elimistössä, tulokset eivät välttämättä ennusta luotettavasti ihmiseen kohdistuvia vaikutuksia eläinlajien ja -yksilöiden välillä esiintyvistä fysiologisista eroista sekä testiolosuhteista johtuen. (Norrby 2007, 589–592.) *In vitro* -testeistä saadut tulokset voivat siten olla yksiselitteisempiä ja luotettavampia kuin eläinmalleista saadut tulokset (Sarkanen ym. 2010, 1). Vaihtoehtoisten ihmissolupohjaisten testimenetelmien käyttö ja kehittäminen on aiheellista myös eläinmallien käyttöön liittyvien eettisten ongelmien

vuoksi (Sarkanen ym. 2010, 1) Ihmissolupohjaisen sydänmallin kehitystyön tavoitteena on eläinkokein suoritettavien toksisuustestien korvaaminen *in vitro* -testillä. Kehitteillä olevia lääkeyhdisteitä testaan nykyään koirilla sydänvaikutustesteissä ja hiirillä tautimallitesteissä. (Ihmissolupohjaisten eläinkokeettomien testimenetelmien kehittäminen ja niistä tiedottaminen 2014.)

2.4 Hyvä laboratoriokäytäntö (GLP)

Hyvä laboratoriokäytäntö eli GLP (Good Laboratory Practice) on kaikkea ei-kliinistä terveys- ja ympäristöturvallisuustutkimusta koskeva laatujärjestelmä, jonka tarkoituksena on edistää korkealaatuisia testaustuloksia. Hyvän laboratoriokäytännön periaatteita tulee noudattaa lääkkeissä, torjunta-aineissa, kosmetiikkatuotteissa, eläinlääkkeissä sekä elintarvikkeiden ja rehujen lisäaineissa ja teollisuuskemikaaleissa käytettävien aineiden turvallisuuden ei-kliinisessä testaamisessa ennen niiden rekisteröimistä ja hyväksymistä. GLP-testaus on myös osa teollisuuskemikaalien valvontaa. (Hyvän laboratoriokäytännön noudattamista koskeva direktiivi, 2004/10/EY).

GLP-laatujärjestelmä määrittelee sen miten tutkimukset suunnitellaan, suoritetaan ja kirjataan sekä toimintamallit, joiden mukaan niitä seurataan ja arkistoidaan ja joiden mukaan niistä raportoidaan. GLP-laatujärjestelmä edesauttaa tutkimuslaadun tulosten kansainvälistä vertailtavuutta ja on edellytys tulosten vastavuoroiselle hyväksymiselle eri maissa. Näin voidaan välttää päällekkäisiä testauksia ja säästää aikaa ja varoja. (Hyvän laboratoriokäytännön noudattamista koskeva direktiivi, 2004/10/EY)

Käytännön laboratoriotyössä GLP-laatujärjestelmän noudattaminen tarkoittaa työntekijän kouluttautumista ja työskentelyn järjestelmällistä dokumentointia. Työntekijän on rekisteröitävä kaikki tutkimuksen suorittamisen aikana tuotetut tulostiedot välittömästi, tarkasti ja luettavasti allekirjoituksella tai nimikirjaimilla ja päivämäärällä varustettuna. Muutokset näihin raakatietoihin tehdään allekirjoitettuna ja päivämäärällä varustettuna siten, ettei alkuperäinen merkintä peity. (Hyvän laboratoriokäytännön noudattamista koskeva direktiivi, 2004/10/EY)

2.5 Tutkimussovellukset

2.5.1 Angiogeneesimalli

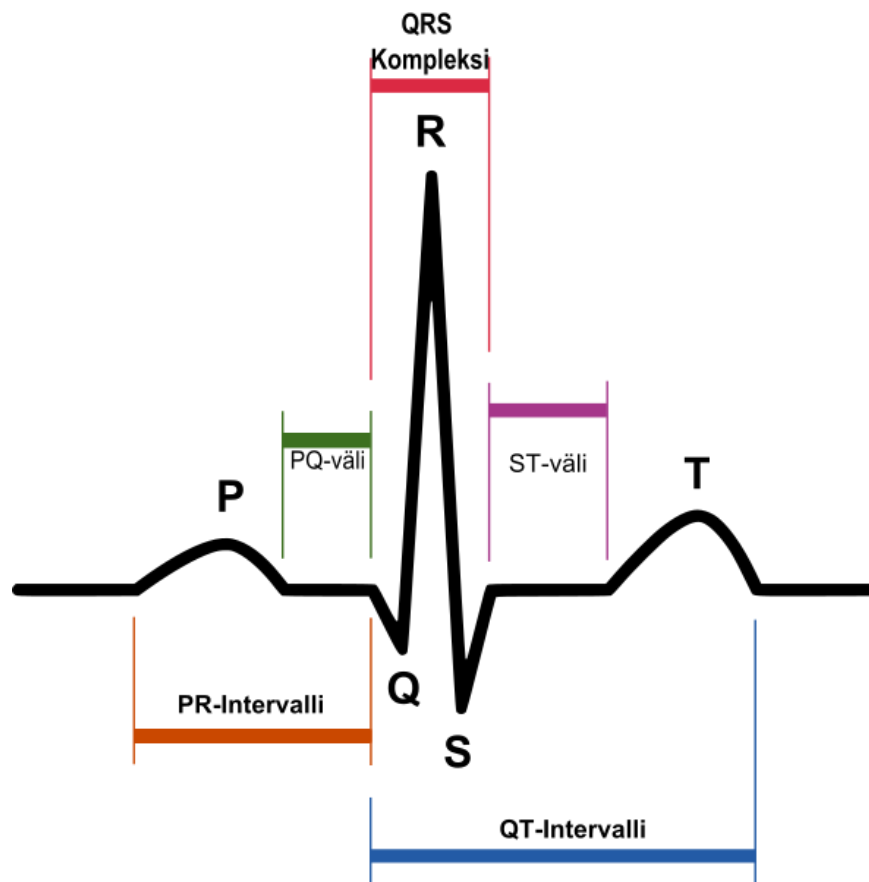
Angiogeneesi tarkoittaa verisuonirakenteiden muodostumista. Kantasolupohjainen angiogeneesisolumalli jäljittelee elimistössä tapahtuvaa verisuonirakenteiden muodostumisprosessia. Kasvatusolosuhteet pyritään rakentamaan siten, että syntyvät rakenteet muistuttaisivat kypsyviä verisuonirakenteita sekä morfologisesti että geneettisesti. Angiogeneesimallin avulla voidaan tarkastella yhdisteiden vaikutusta verisuonimaisten rakenteiden kehitykseen ja solujen morfologiaan *in vitro*. (Sarkanen ym. 2012, 385–397) *In vitro* –mallit eivät kata koko angiogeneesiprosessia, mutta jäljittelevät hyvin prosessin pääpiirteitä. *In vitro* –mallien avulla voidaan analysoida solujen proliferaatiota ja migraatiota sekä erilaistumista. Verrattuna *in vivo* –angiogeneesimalleihin *in vitro* –malleihin perustuvien testien suorittaminen on edullisempaa ja nopeampaa. (Donovan, Brown, Bishop & Lewis 2001, 113–121.)

Angiogeneesimalleista saatavaa tutkimustietoa voidaan hyödyntää kehitettäessä hoitoja sairauksiin, joihin liittyy haitallista verisuonten muodostusta. Patologinen angiogeneesi vilkastuttaa aineenvaihduntaa ja kudosten kasvua tavalla, joka aiheuttaa potilaalle oireita. Patologista angiogeneesiä esiintyy muun muassa silmäsairauksissa, reumassa ja syöpätaudeissa. Syöpäkasvaimet erittävät ympäristöönsä angiogeneesiä stimuloivia yhdisteitä, jolloin lisääntyneen verisuonikudoksen myötä syöpäkasvain saa kasvuunsa tarvittavat yhdisteet sekä väylän metastoitua, eli levitä muualle elimistöön. (Hoff & Machado 2012, 825–833.) Angiogeneesimallin avulla voidaan etsiä ja tutkia syöpäkasvainten angiogeneesiä inhiboivia yhdisteitä. Verisuonimalli toimii myös kudoksen kasvua edesauttavana alustana esimerkiksi *in vitro* –sydänkudosmalleissa sekä kehiteltäessä uudenlaisia kudossiirteitä. (Sarkanen ym. 2012, 385–397.)

2.5.2 Sydänmalli

Sydänsolumallia käytetään lääkeainetutkimuksessa, toksisuustesteissä ja sydänkudosmallin kehitystyössä. Lääkeaineen haitallinen vaikutus sydänkudoksen toiminnassa voidaan havaita sydänlihassolujen sähköisen aktiivisuuden muutoksina. Sydänmallin kar-

diomyosyyttien sähköistä aktiivisuutta kuvaava signaali muistuttaa vaiheiltaan lääketieteellisessä diagnostiikassa käytettyä sydämen toimintaa kuvaavaa elektrokardiogrammia (EKG) eli sydänsähkökäyrää (kuva 3). (Reppel ym. 2005, 166–170).



KUVA 3. Sydämenlyönnin vaiheet (Kuva: Wikimedia commons 2007b, muokattu).

Sydämen sähköisen jännitteen voimakkuus esitetään kuvaajassa pystysuoralla akselilla vaakasuoralla akselilla olevan ajan funktiona. Sydämen rytmiä säätelevä sinussolmuke sijaitsee oikeassa eteiskammiossa, josta P-aaltona näkyvä impulssi saa alkunsa. Kokonaisuudessaan P-aalto kuvaa sydäneteisten aktivoitumista impulssin kulkiessa oikean eteisen kautta vasempaan eteiseen. PR-intervallin aikana impulssi kulkeutuu sydämen oikean eteisen sinussolmukkeelta sydänkammion sydänlihassoluille. QRS-kompleksi kuvaa impulssin yhtäaikaista jakautumista sydämen oikean ja vasemman kammion seinämien lihassoluille. QT-intervallin aikana kammion kardiomyosyyttien jännitetaso palautuu ennalleen, minkä vuoksi QT-intervallia kutsutaan repolarisaatiovaiheeksi. (Wagner 2001, 17–20.)

Lääkeainetutkimuksissa yhdisteen toksisuus ilmenee usein repolarisaatiovaiheen viivästyminä, mikä näkyy kuvaajassa QT-intervallin pidentymänä (Reppel ym. 2005, 166–

170). QT:n pidentymä on tärkeä toksisuuden indikaattori, sillä pidentymä voi aiheuttaa hengenvaarallisen rytmihäiriön. Euroopan lääkeeturallisuuden valvova yksikkö EMA (European Medicines Agency) onkin antanut suosituksen uusien lääkeaineiden QT-vaikutusten kartoittamisesta GLP-olosuhteissa suoritetuilla *in vitro*-testeillä *in vivo* –testien lisäksi, sillä erilaiset lääkeaineet voivat aiheuttaa QT-ajan pidentymiä. (European Medicines Agency 2005.)

Sydänsolumallissa yhdisteiden vaikutusta voidaan tarkastella sydänlihassolujen sähköistä aktiivisuutta mittaamaan kehitettyjen MEA-viljelyalustojen (MEA, micro electrode array) avulla. MEA-alustojen päällä kasvatettujen ihmisperäisten sydänlihassolujen sykkimisnopeus ja mitatun signaalin muoto vastaavat *in vivo* -mittauksissa saatuja tuloksia. MEA-alustojen avulla voidaan määrittää sydänlihassolujen sykkimistiheys, rytmin synkronisuus, sähköimpulssin johtuminen kudoksessa sekä repolarisaatioaika. (Reppel ym. 2005, 166–170.)

Sydänlihassoluja voidaan tutkia sellaisenaan yksisoluviljelmänä tai monisoluviljelminä. Yksisoluviljelma sisältävää ainoastaan kardiomyosyyttejä, kun taas monisoluviljelmät sisältävät myös muita sydänkudokselle tyypillisiä soluja. Näin sydänlihassoluille pyritään rakentamaan sydämen luonnollista ympäristöä muistuttavat olosuhteet. (Vuorenpää ym. 2014, 275.) Ongelmana on ollut solujen irtoaminen MEA-alustoilta ennen toksisuustesteihin tarvittavan viljelyajan ja solujen maturaatioasteen saavuttamista.

2.6 Ihmissolumallin rakentaminen

Useissa angiogeneesimalleissa käytetään ihmisperäisiä rasvakudoksesta eristettyjä stroomasoluja (hASC, human adipose stromal cell) yhdessä napanuoralaskimosta eristettyjen endoteelisolujen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) kanssa (Borges ym. 2003, 1263–1270). Tässä tutkimuksessa käytetyt kardiomyosyytit ovat embryonaalisista kantasoluista ja iPS-soluista (iPS, induced pluripotent stem cell) erilaistettuja sydänlihassoluja.

2.6.1 Angiogeneesimallin solut

Kuten luuytimen kantasolut, osa rasvakudoksen stroomasoluista säilyttää erilaistumiskykynsä ja voi ilmentää, kasvuolosuhteista riippuen, esimerkiksi osteogeenistä, neurogeenistä tai myogeenistä erilaistumista *in vitro*. Angiogeneesimallissa hASC:it edesauttavat verisuonimaisten rakenteiden muodostumista ja pystyvät erilaistumaan sekä kypsiiksi endoteelisoluiksi että verisuoniverkostoa tukeviksi soluiksi (perisytyt, sileät lihasolut) (de Villiers, Hourel & Abrahamse 2009, 256; Cai ym. 2011, 442). Stroomasolujen erilaistumisominaisuuksien lisäksi käytön etuna on solujen korkea viabiliteetti, kasvunopeus ja geneettinen stabiilius pitkäaikaisesti viljeltynä. Lisäksi stroomasolut tuottavat soluväliaineeseen angiogeneesia indusoivia kasvutekijöitä, joilla on myös luonnollisissa olosuhteissa samankaltainen vaikutus. (Strem ym. 2005, 132–141; Cai ym. 2011, 435–447.)

Angiogeneesimalli voidaan rakentaa pelkistä endoteelisoluista, joita kasvatetaan soluväliaineen proteiineista koostuvan alustan päällä. Napanuoralaskimon endoteelisolut ovat tutkituimpia endoteelisoluja. Niiden eristäminen on suhteellisen yksinkertainen toimenpide ja solut jakautuvat nopeasti. (Sobzak, Dargatz & Chrzanowska-Wodnicka 2010, 1.) Verrattaessa pelkistä endoteelisoluista koostuvan yksisoluviljelmän rakenteisiin yhteisviljelmässä, jossa on HUVEC:ien lisäksi stroomasoluja, muodostuvat verisuonirakenteet ovat heterogeenisempiä eli ne sisältävät toisiinsa yhteydessä olevia vaihtelevan pituisia verkkomaisia rakenteita. Lisäksi rakenteet muistuttavat enemmän *in vivo* -kapillaarisuonten rakenteita. (Donovan ym. 2011, 113–121; Sarkanen ym. 2012, 385–397.)

Soluja viljellään ensin yksisoluviljelminä. Kun viljelmät ovat konfluentteja, soluista rakennetaan yhteisviljelmä (Huttala 2012, 40–41). Endoteeli- ja stroomasolujen keskinäinen vuorovaikutus johtaa uusien verisuonirakenteiden muodostumiseen ilman lisättyjä kasvutekijöitäkin (Merfeld-Clauss, Gollahalli, March & Traktuev 2010, 2953). Angiogeneesimallissa solujen vuorovaikutuksen lisäksi elatusliuoksen sisältämät kasvua ja jakautumista edistävät yhdisteet saavat aikaan solujen erilaistumisen ja verisuonirakenteiden muodostumisen (Huttala 2012, 40–42).

Angiogeneesi- ja sydänmallissa käytettävät strooma- ja endoteelisolut ovat primäärisoluja. Primäärisolut edustavat kudoksen tyypillistä fenotyyppiä, sillä ne eristetään

suoraan kudoksesta eikä niitä ole siirrostettu eristämisen jälkeen. Solumallissa käytettyjen hASC:ien siirrostusluku on minimoitu ja HUVEC-solujen optimaalinen siirrostusluku angiogeenesimallia varten on tutkittu. Siirrostuksien myötä alun perin heterogeenisessä solupopulaatioissa tapahtuu valikoitumista, jolloin solupopulaatio muuttuu vähitellen geno- ja fenotyybiltään homogeenisemmaksi (Life Technologies 2014, 20). Siirrostuksien myötä tiettyjen solujen, esimerkiksi fibroblastien osuus voi kasvaa viljelmässä (Lodish, Berk & Zipursky 2003, 236). Riippuen solujen luovuttajan perintötekijöistä ja iästä, eri alkuperää olevien primäärisolujen välillä esiintyy vaihtelua (Huttala 2012, 16, 32), mikä on otettava huomioon tutkimuksessa. Solujen kasvupotentiaali ja elinikä ovat rajallisia toisin kuin tietyillä solulinjoilla, esimerkiksi kasvaimista eristetyillä soluilla (Life Technologies 2014, 20).

2.6.2 Kantasolut

Kantasolut voidaan jaotella erilaistumispotentiaalinsa mukaan kolmeen pääryhmään: totipotentit, pluripotentit ja multipotentit kantasolut. Hedelmöittynyt munasolu on totipotentti eli siitä saavat alkunsa kaikki alkion solut sekä istukka ja sikiökalvot. Soluja, jotka kykenevät erilaistumaan miksi tahansa solukerrostyypin soluiksi, kutsutaan pluripotentteiksi soluiksi, kun taas multipotentteilla soluilla erilaistuminen on rajoittuneempaa. (Kolios & Moodley 2013, 3–4.)

Multipotentteja kantasoluja ovat esimerkiksi luuytimen solut ja veren eri solutyypeiksi erilaistuvat hematopoieettiset solut (Pekkanen-Mattila 2010, 23). Myös pieni osa rasvakudoksesta eristettujen stroomasolujen populaatiosta (ASC, adipose-derived stromal cells) voidaan luokitella kantasoluiksi tiettyjen kantasolumarkkereiden ekspression perusteella. (Dominici ym. 2006, 315–317.)

2.6.3 Alkion kantasolut

Ihmisperäisiä, blastokystin sisäkerroksen solukosta eristettyjä pluripotentteja kantasoluja (hESC, human embryonic stem cell) on käytetty perustutkimuksessa. Sydäntutkimuksessa ja kudosteknologisissa sovelluksissa alkion kantasolut ovat osoittautuneet hyödyllisiksi. Alkiosta peräisin olevista kantasoluista voidaan erilaistaa sydämen kardio-

myösytytjää muistuttavia sydänlihassoluja useilla eri menetelmillä, mutta hoidollisten sovellusten kehittäminen on vielä alkuvaiheessa. Huolimatta siitä, että kantasolut ovat peräisin in vitro -hedelmöityshoitojen yhteydessä kehittyneistä ylimääräisistä tai heikkolaatuisista alkioista, jotka muussa tapauksessa olisi hävitetty, solujen käyttöön liittyvät eettiset kysymykset ovat nousseet esteeksi sekä kliiniselle että tutkimuskäytölle useissa yhteisöissä (Pekkanen-Mattila 2010, 5, 17–21; Pfannkuche ym. 2010, 105).

2.6.4 Indusoidut pluripotentit kantasolut

Somaattiset eli jo erilaistuneet solut voidaan palauttaa tilaan, jossa ne muistuttavat erilaistumisasteeltaan alkion kantasoluja. Vuonna 2001 Tadan tutkimusryhmä toteutti fuusion embryonaalisen kantasolun (ES, embryonal stem cell) ja tymosyytin, eli T-lymfosyytin esiasteen välillä (Tada ym. 2001, 1553). Neljä vuotta myöhemmin tutkijaryhmä onnistui aikaansaamaan fuusion ihmisperäisten fibroblastisolujen ja ihmisperäisten ES-solujen välillä. Solut muistuttivat morfologialtaan, kasvuominaisuuksiltaan ja antigeeniekspressioltaan ihmisen embryonaalisia kantasoluja, mutta ongelmana oli solujen tetraploidisuus, mikä tarkoittaa, että kromosomit esiintyivät nelinkertaisina (Yamaka 2008, 2079–2087). Kyseinen ES-solujen ja somaattisten solujen fuusion avulla tapahtunut uudelleenohjelmointi kuitenkin osoitti, että ES-solut sisältävät tekijöitä, jotka indusoivat soluja palaamaan pluripotenttiin tilaan (Cowan, Atienza, Melton & Eggan 2005, 1369–1373.) Somaattisten solujen saattaminen pluripotenttiin tilaan edellyttää ainakin neljän geenin, niin kutsuttujen Yamanaka-faktorien aktivaation. Indusoidut pluripotentit kantasolut eli iPS-solut (Induced Pluripotent Stem Cells) mahdollistavat yksilöityjen kantasoluhoidojen kehittämisen. (Takahashi ym. 2007, 9933–9937.)

2.7 Soluviljely

Soluviljelmässä solut joutuvat keinotekoiseen ympäristöön, jossa soluilla tulee olla solujen luonnollista kasvu ympäristöä muistuttavat olosuhteet lämpötilan, kosteuden ja hiilidioksidipitoisuuden suhteen. Solu viljelmässä solut altistuvat myös kasvatusliuoksen biokemiallisille ja fysikaalisille tekijöille. Solutyypistä riippuen kasvatusliuoksen on sisällettävä aminohappoja, joita esimerkiksi eläinsolut eivät pysty itse tuottamaan sekä vitamiineja, kasvutekijöitä, seerumia, suoloja ja glukoosia energianlähteeksi. Seerumi

on proteiineista koostuva seos, joka sisältää muun muassa hormoneja kuten insuliinia ja edesauttaa soluja jakaantumaan viljelmässä. (Lodish ym. 2003, 235–236). Solujen elinkelpoisuuden lisäksi soluviljely-ympäristöllä voidaan vaikuttaa solujen erilaistumiseen esimerkiksi kasvutekijöiden välityksellä. Erilaistuminen tapahtuu solun pinnalta lähtevien tiedonsiirtokaskadien kautta, mikä saa aikaan kohdegeenien aktivoitumiseen tai inaktivoitumisen. (Blau 2013, 481–492.)

Soluviljelyalustan pinnan on muistutettava kemiallisilta, topologisilta ja rakenteellisilta ominaisuuksiltaan mahdollisimman paljon solujen luonnollisia elinolosuhteita (*in vivo*) soluväliaineen ja muiden solujen ympäröiminä. Alustamateriaalien ja erilaisten pinnoitusmateriaalien ominaisuuksien kartoittaminen ja kehittäminen on ollut pitkään lukuisien tutkimuksien kohteena. (Blau 2013, 481–492.)

2.7.1 Solujen kiinnittyminen

Solukalvon solun ulkopuolinen pinta saa useimmissa eläinsoluissa negatiivisen nettovauruksen johtuen solukalvon negatiivisesti varautuneista yhdisteistä, joista esimerkkeinä glykoproteiinit ja -lipidit. Solukalvon proteiineilla on tärkeä rooli sekä solujen keskinäisessä viestinnässä että solujen ja soluväliaineen välisissä reaktioissa, solujen migraatiossa ja kiinnittymisessä. (Lodish ym. 2003, 235–236.)

Toisin kuin bakteeri- ja hiivasolut, useimmat eläinsolut tarvitsevat pinnan johon kiinnittyä. Suurin osa eläinsoluista kiinnittyy ympäristöönsä soluväliaineen sisältämien, niin kutsuttujen ankkurimolekyylien avulla. Adherenttejä eläinsoluja viljeltäessä käytetään yleensä pinnaltaan hydrofiiliseksi muokattuja viljelyalustoja, joihin solut voivat kiinnittyä soluväliaineeseen erittämiensä yhdisteiden, kuten esimerkiksi kollageenin ja fibronectiinin välityksellä. (Lodish ym. 2003, 236.)

Luonnollisessa ympäristössään solut tuottavat soluväliaineen yhdisteitä jatkuvasti jolloin soluväliaine uusiutuu, mutta kasvatusalustalla viljeltäessä uusiutuminen on hitaampaa. Solut voivat kasvaa lasin päällä, mutta usein muovista ja lasista valmistetut alustat joudutaan pinnoittamaan. Erityisesti MEA-viljelyalustojen käytössä on haasteena alustojen pinnan muotoon vaikuttavat tekniset komponentit sekä niiden kiinnitykseen käytettävät usein soluille jopa toksiset yhdisteet. Viljelyalustojen pinnoitukseen käytetään

yleensä yhdisteitä, joita solut luonnostaankin erittävät soluväliaineeseen, kuten kollageenia ja fibronektiiniä. Viljelyalustan esikättelymenetelmillä, kuten happiplasmakäsittelyllä, voidaan vaikuttaa viljelypinnan polaarisuuteen ja sitä kautta pinnoitusmateriaalien ja solujen kiinnittymiseen. (Cooke ym. 2008, 71; Blau 2013, 481–492.)

2.7.2 Pinnoitusmateriaalit

Fibronektiini

Fibronektiiniä tuottavat lähes kaikki sidekudoksen solut. Sitä esiintyy runsaasti liukoisessa muodossa niin solujen välisessä plasmassa kuin myös solukalvon pintarakenteissa. Liukenemattomassa muodossa fikbronektiinimolekyylit muodostavat kuitumaisia rakenteita soluväliaineeseen. Liukoinen fibronektiini on rikkisidoksella toisiinsa kiinnittyneiden, kahden lähes identtisen polypeptidin muodostama glykoproteiini. Sillä on runsaasti rakenteellisesti ja toiminnallisesti toisistaan poikkeavia domeeneja, joiden välityksellä se sitoutuu solun pintarakenteisiin ja plasman proteiineihin. Elimistössä fibronektiinin eräs lukuisista tehtävistä onkin auttaa soluja kiinnittymään soluväliaineeseen. Se säätelee solujen muotoa ja järjestäytymistä. Integriinien välityksellä se säätelee myös kasvua, liikkumista ja erilaistumista. (Lewin, Cassimeris, Lingappa & Plopper 2007, 652.) Fibronektiinin käyttö edesauttaa solujen levittäytymistä ja kiinnittymistä kasvatusalustaan. Solujen kiinnittymisen kannalta yksi fibronektiinin tärkeistä epitoopeista on kolmesta aminohaposta, arginiinista, glysiinistä ja asparagiinista (Arg-Gly-Asp) muodostuva rakenne. (Sitterley 2008, 8.) Tässä tutkimuksessa käytettiin ihmisperäistä plasmasta eristettyä fibronektiiniä.

Tyvikalvo

Tyvikalvo on soluväliaineessa sijaitseva ohut, levymäinen erikoisrakenne, johon solut voivat kiinnittyä. Epiteelisolut tuottavat tyvikalvon rakenneosia. Tyvikalvon perustan muodostavat laminiinista ja IV-tyypin kollageenista koostuvat polymeerit, joihin on sitoutuneena myös muita glykoproteiineja. Lamiini sisältää useita domeeneja, joihin sitoutumalla sekä solut että tyvikalvon rakenneosat ankkuroituvat tyvikalvoon. Lamiiniin sitoutuu myös soluväliaineen muita yhdisteitä, kuten kasvutekijöitä ja hormoneja. (Lodish ym. 2003, 211–212.) Lamiini koostuu kahdesta toisiinsa rikkisidoksella liittyneestä glykopeptidiketjusta. Lamiini eroaa fibronektiinista aminohappojärjestyksensä ja immunologisten ominaisuuksiensa perusteella. Kuten fibronektiinilla, myös lami-

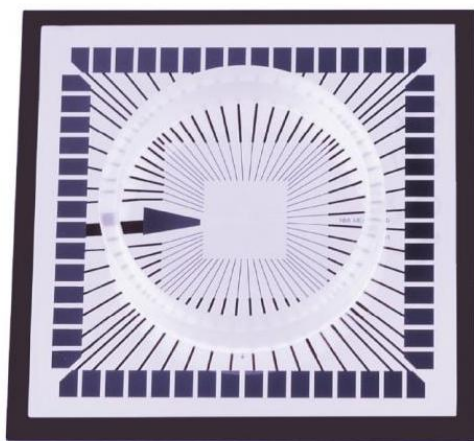
niinilla on useita vaikutuskohteita solujen toiminnassa. Se osallistuu erilaistumisen, jakaantumisen, kiinnittymisen ja järjestäytymisen säätelyyn. Kollageeni IV on 400 nm pitkä kollageeniryhmän proteiini, jota esiintyy pääasiallisesti vain tyvikalvossa. Kuten kaikki kollageeniryhmän proteiinit, kollageeni IV koostuu kolmesta proteiinialayksiköstä (α -ketjusta). Se toimii kiinnittymisalustana tyvikalvon muille rakenneosille, mutta myös tyvikalvoon kiinnittyville soluille. Kollageeni IV –molekyylit muodostavat ristikkomaisen rakenteen, joka toimii tyvikalvon muiden osien alustana. (Kühn 1995, 439–445; Lodish ym. 2003, 212.)

Gelatiini

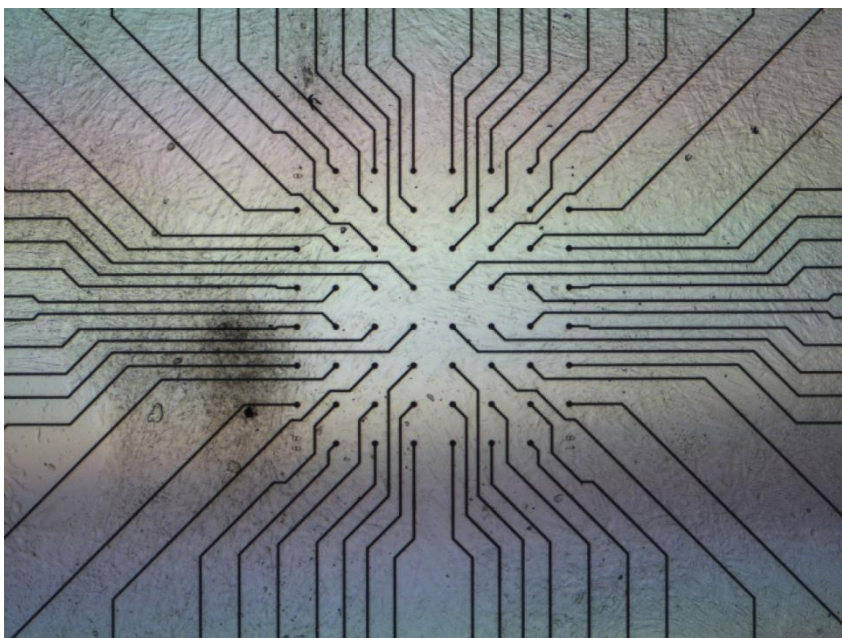
Gelatiini on useista proteiineista koostuva vesiliukoinen seos, jota muodostuu kollageenin hydrolysoituessa. Gelatiini on eläinperäinen tuote, jota voidaan eristää ihosta, luusta tai sidekudoksesta. Gelatiinivesiliuosta kuumennettaessa se on liukoisessa muodossa, mutta jäähtyessään muuttuu viskoosiksi. Gelatiini on yleisesti käytössä soluviljelyssä sen solujen kiinnittymistä tehostavan vaikutuksen vuoksi. (Young, Wong, Tabata & Mikos 2005, 256–274, Blaun 2013, 484 mukaan.)

2.8 Micro electrode array (MEA) -kasvatusalustat

Markkinoilla oleva yritys Multichannel System valmistaa noin kahtakymmentä erilaista käyttötarkoituksiin soveltuvaa micro electrode array –alustatyyppiä (MEA). Tässä luvussa esitellään näistä kaksi: standardityyppinen MEA (kuva 4) ja kuusikaivoinen MEA. Standardimallinen MEA koostuu tyypillisesti 60:sta halkaisijaltaan 30 μm :ia olevasta rinnakkaisesta elektrodista, jotka sijoittuvat lasisen alustan keskiosaan kuvan 5 mukaiselle 8x8-ruudukolle 200 μm :n välein. (Multichannel Systems 2014c, Microelectrode array (MEA) manual, 10).

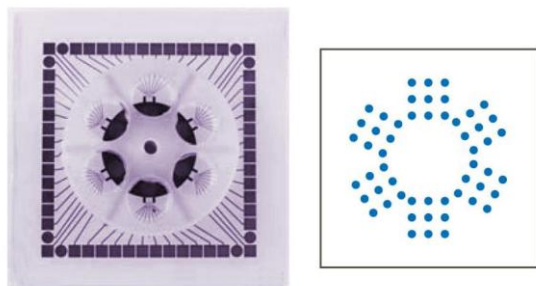


KUVA 4. Standardikokoinen MEA-alusta (Kuva: Multichannel Systems 2014d, muokattu).



KUVA 5. Mikroskooppikuva standardimallisesta MEA-alustasta.

Kuusikaivoisen MEA:n yksittäisessä kaivossa on vastaavasti yhdeksän halkaisijaltaan $30\text{ }\mu\text{m}$:n pituista elektrodia 3×3 ristikkomuodostelmassa. Elektrodit sijoittuvat jokaiseen kaivoon kuvan 6 mukaisesti. Kuusikaivoisessa MEA:ssa viljelypinta-ala on $0,32\text{ cm}^2$, jolloin etuna on, että soluja tarvitaan vähemmän verrattuna standardimalliseen MEA:aan, jonka viljelypinta-ala on $3,5\text{ cm}^2$. Solut voidaan siirrostaa suoraan kammiossa olevien elektrodien päälle, sillä kammio toimii kasvatusalustana. (Multichannel Systems 2014c, Microelectrode array (MEA) manual, 10–23).



KUVA 6. Kuusikaivoinen MEA-alusta ja elektrodien sijainnit (Kuva: Multichannel Systems 2014a, muokattu).

MEA-alustojen elektrodit on valmistettu titaniumnitridistä (TiN) näennäisvastuksen vähentämiseksi. Elektrodeista lähteviä signaaleja vahvistimille siirtävät johtimet on tyyppillisesti valmistettu titaniumista ja päällystetty häiriöiden ehkäisemiseksi eristävillä piiyhdisteillä. Levyn reunoilla sijaitsevat vahvistimet on valmistettu kullasta. Referenssielektrodi on useissa MEA-tyypeissä sisäänrakennettuna. Yksittäinen elektrodin antama signaali kuvaa kalvopotentiaalin muutosta elektrodin läheisyydessä. Elektrodit pysyvät havaitsemaan signaalin, jonka lähde on 30 μm :n säteellä elektrodista. (Reppel ym. 2005, 166–170.)

2.8.1 Happiplasmakäsittely

MEA-alustojen elektrodien eristysmateriaalina käytetyt yhdisteet, kuten piinitridi tai piioksidi, muuttuvat erityisesti levyjen säilytyksen aikana hydrofobiseksi, mikä heikentää solujen ja pinnoitusmateriaalien kiinnittymistä alustalle. Happiplasmakäsittelyssä MEA-alustojen pinta altistetaan kaasumaiselle happiplasmalle alipaineistetussa kammiassa, mikä saa aikaan muutoksia pinnan molekyylien kolmiulotteisessa rakenteessa ja suuntautumisessa, jolloin pinta muuttuu polaariseksi. (Grosberg, Alford, McCaina & Parker 2011, 4165–4173.) Pinnan hydrofiilisyyden tehostaa solujen kiinnittymistä. Hydrofiilisyyden lisäksi käsittely steriloi pinnan tehokkaasti. Vaikutus kuitenkin heikkenee nopeasti. Happiplasmakäsittelyt MEA:t voidaan pinnoittaa vesiliukoisilla pinnoitusmateriaaleilla. (Wan ym. 2004, 4777–4783.)

2.8.2 MEA-mittaukset

MEA-alustan elektrodien havaitsemat kalvopotentialimuutokset siirtyvät vahvistimen kautta tietokoneelle, jossa data tallennetaan, analysoidaan ja muutetaan graafiseen muotoon MC_Rack –ohjelman avulla. Graafisessa muodossa jännitteen voimakkuudessa tapahtuvat muutokset on esitetty ajan funktiona. Mittauksia aloitettaessa MEA-alusta asetetaan vahvistimeen, jolloin alustan elektrodeihin yhteydessä olevat kontaktialustat ovat kosketuksissa vahvistimesta lähteviin pinneihin kannen ollessa suljettuna (kuva 7). Vahvistin muuttaa analogisen datan digitaaliseen muotoon ja siirtää sen tietokoneeseen liitäntäyksikön kautta. Kontaktialustat tulee puhdistaa alkoholilla ennen jokaista mittausta, sillä vaikeasti havaittavatkin ohuet rasvajäämät kontaktialustojen päällä heikentävät kontaktialustan ja vahvistimen pinnien välistä yhteyttä. Vahvistimesta peräisin oleva taustakohina on riippuvainen MEA-alustan elektrodien koosta. Pienillä, halkaisijaltaan 30 μm olevilla elektrodeilla taustakohina on suurimmillaan $\pm 10 \mu\text{V}$. (Multichannel Systems 2014c, Microelectrode array (MEA) manual, 49–51.)



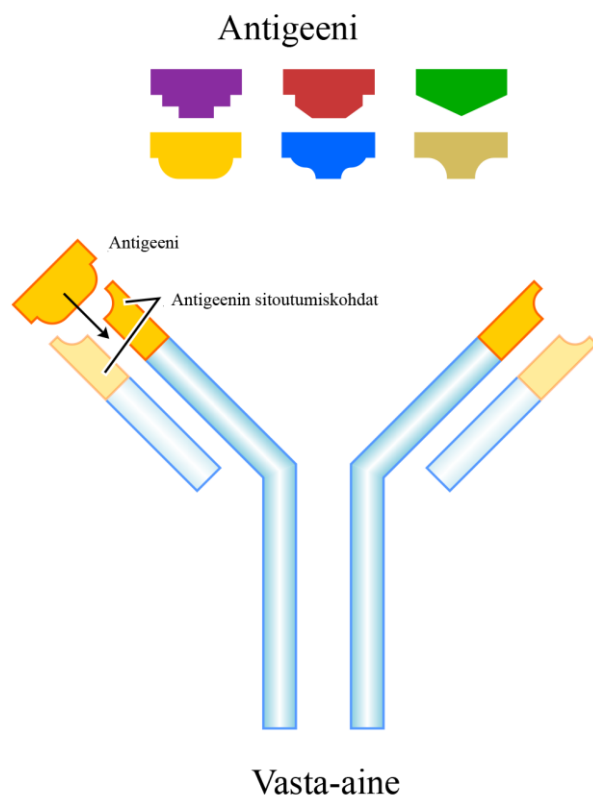
KUVA 7. Esimerkkikuva MEA-mittauksissa käytettävästä laitteesta (Kuva: Multichannel Systems 2014b, muokattu).

Dataa voidaan nauhoittaa pitkältä aikaväliltä soluja vahingoittamatta, sillä mittausalustan lämpötila voidaan säätää lämmitysyksikön avulla 37 °C:een. Ilmateitse tapahtuva näytteen kontaminoituminen ja kuivuminen mittausten aikana estyy puoliläpäisevien suojakalvojen avulla, jotka asetetaan MEA-alustojen päälle. (Multichannel Systems 2014c, Microelectrode array (MEA) manual, 49–51.)

2.9 Immunovärjäys

Vasta-aineet ovat immunoglobuliiniproteiineja (Ig), joita plasman solut tuottavat seerumiin antigeenien aikaansaaman stimulaation vaikutuksesta. Vasta-aine koostuu kahdesta raskaasta ketjusta, kahdesta kevyestä ketjusta ja kahdesta antigeeniä sitovasta kohdasta (kuva 8). Rakenteellisten ominaisuuksiensa ansiosta vasta-aineet erottavat spesifisesti antigeeninsä ja kykenevät muodostamaan sidoksia näiden kanssa. (Eales 2004, 41.)

Immunovärjäyksessä vasta-aineita hyödynnetään näytteen rakenteiden tunnistamisessa ja paikallistamisessa. Vasta-aine valitaan siten, että se kiinnittyy spesifisesti antigeeniin, eli tutkittavaan yhdisteeseen solussa. Suorassa värjäyksessä fluoresoiva värjäysaine on kiinnitetty primääriseen vasta-aineeseen, eli vasta-aineeseen, joka sitoutuu spesifisesti haluttuun kohdemolekyyliin näytteessä. Epäsuorassa värjäyksessä värjäys tehdään kahdessa vaiheessa. Ensin näyte käsitellään primäärisellä värjäysaineella, jolloin primäärivasta-aine sitoutuu tutkittavaan kohteeseen soluissa. Fluoresoiva väriyhdiste on kiinnitetty sekundääriseen vasta-aineeseen, joka kiinnittyy spesifisesti primääriseen vasta-aineeseen. (Eales 2004, 41–42.)



KUVA 8. Vasta-ainemolekyylin kaaviokuva (Kuva: Wikimedia Commons 2007a, muokattu).

3 TYÖN SUORITUS

Työ jaettiin kolmeen koeosioon. 1. koeosiossa tutkittiin pinnoitusmateriaalien vaikutusta pelkkään angiogeenesimalliin eri kasvatusalustoilla. 2. koeosiossa tutkittiin 1. koeosion tulosten perusteella valittujen pinnoitemateriaalien vaikutusta hESC-pohjaisen sydänmallin kiinnittymiseen ja solujen morfologiaan eri alustoilla. 3. koeosiossa tutkittiin pinnoitemateriaalien vaikutusta iPS-solupohjaiseen sydänsolumalliin eri alustoilla. 2. ja 3. koeosiossa MEA-alustoille tehtiin happiplasmakäsittely. Kokeiden kulku on kuvattu pääpiirteittäin luvussa 3.1.3 olevassa kaaviossa 1. Kokeet suoritettiin GLP:n mukaisesti.

3.1 Soluviljelyolosuhteet

3.1.1 Solujen alkuperä

Työssä käytetyt endoteeli- ja stroomasolut olivat peräisin Tampereen yliopistollisesta sairaalasta kirurgistentoimenpiteiden yhteydessä otetuista kudoksenäytteistä sekä napanuoranäytteistä. Solut oli eristetty ja säilötty FICAM:n laboratorion oman protokollan mukaisesti.

Sydänmallin rakentamiseen käytetyt sydänlihassolut, hESC-CM (Human Embryonic Stem Cell Cardiomyocyte) ja iPS-kardiomyosyytit (iCell cardiomyocyte) olivat peräisin kaupallisilta valmistajilta (Cellectis ja Cellular Dynamics International®). Cellectisin valmistamat hESC-kardiomyosyytit oli eristetty alkion kantasolulinjasta. Cellular Dynamicsin ihmisperäiset kardiomyosyytit oli eristetty indusoiduista kantasoluista (iPS) Cellular Dynamics Internationalin (CDI) erilaistus- ja puhdistusprotokollaa noudattamalla. Sekä hESC- että iPS-sydänlihassolut koostuivat heterogeenisestä solupopulaatiosta. Heterogeeninen sydänlihassolupopulaatio sisältää biokemiallisesti, toiminnallisesti ja elektrofysiologisesti sydämen eri osien myosyyttejä muistuttavia soluja, jollaisia esiintyy sydämen eteis-, kammio- ja solmukekohdissa.

3.1.2 Solujen käsittely

Soluja ja työvälineitä käsiteltiin laboratoriossa aseptisissa olosuhteissa. Strooma- ja endoteelisolujen mediuumeissa ei käytetty antibiootteja. Viljelyalustoja säilytettiin inkubaattorissa 37 °C:ssa. Hiilidioksiditaso oli säädetty 5 %:iin, jotta viljelmän pH pysyisi tasaisena. Inkubaattorin kosteustaso vakioitiin pitämällä steriiliä vettä astiassa inkubaattorin sisällä.

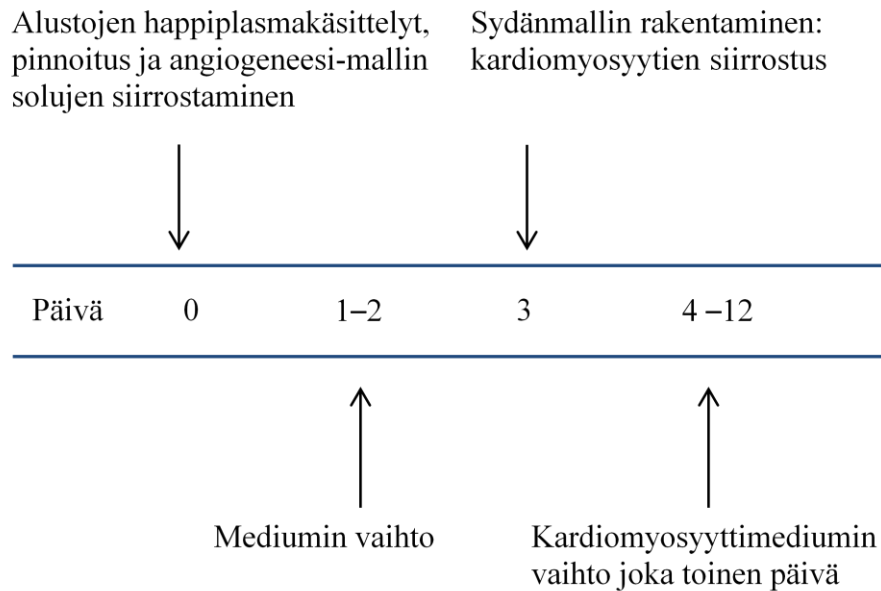
HUVEC- ja hASC-ampulleja säilytettiin $0,5 - 1,0 \times 10^6$ solun erissä nestetyypipakastimessa. Solut oli numeroitu siten, että kunkin solulinjan luovuttajan ikä, sukupuoli ja painoindeksi olivat tiedossa. Säilytysajan pituus vaihteli solulinjoittain. Sulan pakastusnesteen toksisten vaikutusten minimoimiseksi sulatus tehtiin mahdollisimman nopeasti 37 °C:ssa vesihauteessa. Sulaneet solut suspensoitiin 15 ml:n sentrifugiputkissa 10 ml:aan esilämmitettyä kasvatusmediumia. Työtä varten valmistettujen kasvatusmediumien sisältö on esitetty tarkemmin liitteessä 1.

Putkia sentrifugoitiin (131 x g, 5 minuuttia) ja solupelletti suspensoitiin millilitraan kasvatusliuosta. Solususpensio siirrostettiin kasvatuspulloon ja viljeltiin inkubaattorissa kunnes kasvusto oli konfluentti. HUVEC-viljelmä oli konfluentti sulatuspäivästä laskien noin neljän vuorokauden jälkeen ja hASC-viljelmä noin 10 vuorokauden jälkeen. Medium vaihdettiin sulatusta seuraavana päivänä ja tämän jälkeen 2 – 3 vuorokauden välein. Kun solut olivat konfluentteja, aloitettiin angiogeneesimallin rakentaminen (luku 3.1.3) pinnoitemateriaaleilla käsitellyille kasvatusalustoille (luku 3.2.2).

Työssä käytettiin 48-kuoppalevyjä ja 24-kuoppalevyjä, joista jälkimmäisen kuoppien pohjalle asetettiin peitinlasi, kahdeksankaivoisia IbiTreat-pinnoitettuja hydrofiilistä materiaalia olevia ibidi-levyjä (8 well 15 µ-Slide IbiTreat), sekä yksi- ja kuusikaivoisia MEA-alustoja.

3.1.3 Angiogeneesimallin rakentaminen

Solumallin rakentamiseen liittyvät työvaiheet on kuvattu pääpiirteittäin kaaviossa 1.



KAAVIO 1. Solumallin rakentamisen vaiheet.

Angiogeneesimallin rakentaminen alkoi stroomasolujen (hASC) irrottamisella kasvatuspullosta trypsiinikäsittelyllä (Tryple Express). Medium imettiin pois ja soluja huuhdeltiin Tryple Express –liuoksella (1 ml) ja imettiin välittömästi pois. Tilalle pipetoitiin 2,5 ml Tryple Expressiä ja soluja inkuboitiin 37 °C:ssa CO₂-inkubaattorissa 8 minuutin ajan. Solujen irrottua tilalle pipetoitiin 5 ml HUVEC-mediumia ja aspiroitiin pipetillä. Solususpensiota sentrifugoitiin (131 x g, 5 min.), jonka jälkeen solupelletti suspensoitiin yhteen millilitraan HUVEC-kasvatusliuosta. Solususpensiota pipetoitiin solujen laske- mista varten 20 µl:aa, joka suspensoitiin 180 µl:aan 0,2 % trypan blue –liuosta. Solut laskettiin Bürkerin laskukammiossa kahdeksasta pinta-alaltaan 1 mm² olevasta ruudusta. Solujen määrä yhdessä millilitrassa määritettiin yhtälön 1 mukaan (taulukko 1). Solususpensiosta valmistettiin eri kasvatusalustoille sopivat laimennokset yhtälön 2 osoittamalla tavalla. Taulukkoon 2 on koottu lopulliset solutiheydet ja siirrostustilavuudet. Endoteelisolut irroitettiin kasvatusalusta, käsiteltiin ja laskettiin kuten edellä (taulukko 3). Siirrostus tehtiin taulukon 4 mukaisesti. Solujen annettiin kiinnittyä 24 tuntia inkubaattorissa. HUVEC-medium vaihdettiin kaksi päivää siirrostuksen jälkeen.

$$C(\text{solususpensio}) = n(KA) \times 100000 \quad (1)$$

$$V(\text{solususpensio}) = \frac{n(\text{tavoite})}{C(\text{solususpensio})} \times lkm \quad (2)$$

$C(\text{solususpensio})$ = solujen määrä solususpensiossa, s/ml

$n(KA)$ = kammiossa laskettujen solujen keskiarvo

$V(\text{solususpensio})$ = siirrostettavan suspension tilavuus, ml

$n(\text{tavoite})$ = solujen määrä alustan kuoppaa kohden

lkm = kasvatusalustan kuoppien lukumäärä

TAULUKKO 1. Stroomasolujen lukumäärä.

<u>Pinnoituskoee</u>	<u>Solutunniste</u>	<u>Solujen määrä</u>
1.	hASC027/ 2 ampullia	$1,9 \times 10^6$ solua
2.	hASC042/ 2 ampullia	$1,5 \times 10^6$ solua
3.	hASC042	$0,875 \times 10^6$ solua
	hASC042	$0,775 \times 10^6$ solua

TAULUKKO 2. Stroomasolujen solutiheydet ja siirrostustilavuudet eri formaateilla.

<u>Kasvatusalusta</u>	<u>Haluttu solutiheys (s/ml)</u>	<u>Siirrostustilavuus (μl)</u>
MEA (standardi)	$0,14 \times 10^6$	500
MEA (kuusikaivoinen)	$0,0516 \times 10^6$	150
48-kuoppalevy	$0,088 \times 10^6$	250
24-kuoppalevy (peitinlasi)	$0,076 \times 10^6$	500
Ibidi	$0,133 \times 10^6$	150

TAULUKKO 3. Endoteelisolujen lukumäärät.

<u>Pinnoituskoee</u>	<u>Solutunniste/ampulli</u>	<u>Solujen määrä</u>
1.	HUVEC020	$2,5 \times 10^6$ solua
2.	HUVEC020	$2,93 \times 10^6$ solua
3.	HUVEC020	$2,1 \times 10^6$ solua

TAULUKKO 4. Endoteelisolujen solutiheydet ja siirrostustilavuudet eri formaateilla.

<u>Kasvatusalusta</u>	<u>Haluttu solutiheys (s/ml)</u>	<u>Siirrostustilavuus (µl)</u>
MEA (standardi)	$0,028 \times 10^6$	500
MEA (kuusikaivoinen)	$0,0103 \times 10^6$	150
48-kuoppalevy	$0,018 \times 10^6$	250
24-kuoppalevy (peitinlasi)	$0,0152 \times 10^6$	500
Ibidi	$0,0267 \times 10^6$	150

3.1.4 Sydänlihassolujen siirrostus

Sydänlihassolut siirrostettiin aina angiogeneesimallin kokoamisen jälkeen kolmantena päivänä (päivä 3). Toisessa pinnoituskokeessa käytettiin hESC-kardiomyosyyttejä. Solut sulatettiin pitämällä putkia 37 °C:ssa vesihauteessa varovasti keinuttaen. Esilämmitettyä sulatusmediumia (liite 1) lisättiin hitaasti 1 ml yhtä pakastusputkea kohden. Putken sisältö siirrettiin 15 ml:n sentrifugiputkeen, jossa oli 8 ml esilämmitettyä sulatusmediumia. Putkea sentrifugoitiin (250 g x 5 min), minkä jälkeen supernatantti poistettiin ja solupelletti suspensoitiin 3 ml:aan sulatusmediumia. Solutiheys ja –viabiliteetti määritettiin Bürkerin laskukammiossa (taulukko 5) ja solut siirrostettiin kasvatusalustoille sulatusmediumiin valmistettuina sopivina laimennoksina. Kardiomyosyyttejä siirrostettiin kolmella eri tiheydellä kaikilla viljelyformaateilla (taulukko 6). Suurin tiheys oli kolminkertainen pienimpään verrattuna. Valmistajan suosittelema siirrostustiheys oli $100\,000 \text{ s/cm}^2$.

TAULUKKO 5. Elävien hESC-kardiomyosyyttien lukumäärä ja soluerän viabiliteetti.

<u>Solut/ampulli</u>	<u>Solumäärä</u>	<u>Viabiliteetti</u>
26-hESC-CM	$2,625 \times 10^6 \text{ s}$	93,33 %
27-hESC-CM	$2,288 \times 10^6 \text{ s}$	89,71 %

TAULUKKO 6. hESC-kardiomyosyyttien määrät eri viljelyformaateilla.

<u>Alustaformaatti</u>	1.	2.	3.
MEA	63 000	127 000	253 000
MEA (6-kaivoinen)	7000	14 000	28 000
48-kuoppalevy	20 000	40 000	80 000
24-kuoppalevy (peitinlasit)	34 000	69 000	137 000
Ibidi	18 000	36 000	72 000

Solujen annettiin kiinnittyä inkubaattorissa (37 °C, 5 % CO₂) 24 h ajan, minkä jälkeen kasvatusalustoille vaihdettiin hESC-kardiomyosyyttien kasvatusmedium (liite 1). Jatkossa medium vaihdettiin joka toinen tai kolmas päivä siten, että puolet kuoppien sisältämästä mediumista pipetoitiin varovasti pois ja korvattiin samalla tilavuudella tuoretta 37 °C:sta hESC-kasvatusmediumia.

Kolmannessa kokeessa sydänlihassoluina käytettiin iPS-kardiomyosyyttejä noudattaen solujen valmistajan ohjeistusta (iCell Cardiomyocytes User's guide, Cellular Dynamics International). Sulatukseen ja kasvatukseen käytettiin valmistajan siirrostus- ja kasvatusliuoksia. Soluja sulatettiin 37 °C:ssa vesihauteessa neljän minuutin ajan putkea paikallaan pitäen, minkä jälkeen sulaneet solut pipetoitiin 50 ml:n sentrifugiputkeen. Pakastusputki huuhdeltiin yhdellä millilitralla huoneenlämpöistä siirrostusmediumia, jonka jälkeen se pipetoitiin hitaasti sentrifugiputkeen (1 tippa 5 sekunnissa) varovasti keinnuttaen. Sentrifugiputkeen lisättiin 8 ml siirrostusmediumia. Ensimmäinen millilitra lisättiin tippa kerrallaan minuutin aikana, jonka jälkeen loput 7 ml:aa lisättiin puolen minuutin aikana. Käsittelyllä pyrittiin parantamaan solujen viabiliteettiä ja kykyä kiinnittyä kasvatusalustaan. Putken sisältöä sekoitettiin varovasti kolmesti kääntelemällä, minkä jälkeen solut laskettiin ja viabiliteetti määritettiin Bürkerin laskukammion avulla (taulukko 7).

TAULUKKO 7. Elävien iPS-kardiomyosyyttien lukumäärä ja soluerän viabiliteetti.

<u>Solut</u>	<u>Lukumäärä</u>	<u>Viabiliteetti</u>
iPS-CM	5,125 x 10 ⁶ s	83,67 %

Valmistajan takaama siirrostustehokkuus käytetylle soluerälle oli 60 %, mikä tarkoitti, että 48 h kuluttua siirrostuksen jälkeen elossa olisi 60 % soluista. Solujen määrä siirrostusta varten laskettiin yhtälön 3 mukaan ottaen huomioon valmistajan antama siirrostus-

tehokkuus. Valmistajan suosittelema siirrostustiheys oli 47 000 – 63 000 kardiomyosyyttiä/cm², jossa on otettu huomioon eräkohtainen siirrostustehokkuus. Kasvatusalustojen HUVEC-medium vaihdettiin 37 °C:een siirrostusmediumiin. Siirrostusmediumia lisättiin ottaen huomioon taulukon 8 osoittamat siirrostustilavuudet, jotta kuoppien kokonaistilavuudet pysyivät vakiona. Solut siirrostettiin suoraan solususpensiosta angiogeenesimallin päälle sopivina tilavuuksina (taulukko 8). Alustoja keinuttamalla pyrittiin saamaan solut levittäytymään tasaisesti alustalle.

$$n(\text{solujen määrä}) = n(\text{KA}) \times 100\,000 \times V \times 0,6 \quad (3)$$

$n(\text{solujen määrä})$ = todellinen solujen lukumäärä

$n(\text{KA})$ = kammiossa laskettu solujen keskiarvo

V = solususpension kokonaistilavuus = 10 ml

Yhtälön 3 mukaisesti laskien solujen lukumääräksi saatiin $3,075 \times 10^6$ solua.

$$n(\text{solujen määrä}) = 5,125 \times 100\,000 \times 10 \text{ ml} \times 0,6$$

$$n(\text{solujen määrä}) = 3,075 \times 10^6 \text{ solua.}$$

TAULUKKO 8. iPS-kardiomyosyyttien määrä ja siirrostustilavuus kuoppaa kohden.

	<u>MEA (6-kaivo)</u>	<u>48-kuoppalevy</u>	<u>24-kuoppalevy</u> <u>(peitinlasit)</u>	<u>Ibidi</u>
Solumäärä	24 400 s	69 300 s	119 700 s	63 000 s
Siirrostustilavuus	79,3 µl	225 µl	389 µl	205 µl
Kokonaistilavuus	300 µl	500 µl	1000 µl	300 µl

Solujen annettiin kiinnittyä 48 h inkubaattorissa (37 °C, 5 % CO₂). 48 h:n jälkeen soluja huuhdeltiin viisi kertaa pipetoimalla siirrostusmediumia varovasti edestakaisin irtonaisten solujen poistamiseksi. Huuhtelun jälkeen siirrostusmedium imettiin pois ja tilalle vaihdettiin 37 °C:een esilämmitettyä kasvatusmediumia. Medium vaihdettiin joka toinen päivä.

3.2 Pinnoituskokeet

Kaikissa pinnoituskokeissa käytettiin kaupallisia fibronektiini-, laminiini- ja kollageenivalmisteita, joista valmistettiin tarvittavat käyttölaimennokset (luku 3.2.2). Referenssipinnoitteeksi valittiin gelatiini, jota oli käytetty aiemmin FICAMIN sydänmalli- ja angiogeneesitutkimusprojekteissa. Ensimmäisessä pinnoituskokeessa käytetyt polyetyyleeni-imini- ja nitroselluloosapinnoitusyhdisteet valmistettiin itse. Polyetyyleeni-imini ja nitroselluloosa valittiin tutkimukseen kirjallisuuden perusteella (Egert & Meyer 2005, 435–453). Polyetyyleeni-iminiä ja nitroselluloosaa sisältävien pinnoitusreagenssien valmistus on kuvattu luvussa 3.2.1.

Toisessa ja kolmannessa pinnoituskokeessa MEA-kasvatusalustoille tehtiin happiplasmakäsittelyt ennen alustojen pinnoittamista, minkä jälkeen angiogeneesimalli rakennettiin kuten luvussa 3.1.3 on kuvattu. Sydänlihassolut siirrostettiin angiogeneesimallin päälle kolmantena päivänä angiogeneesimallin solujen siirrostuksen jälkeen. Happiplasmakäsittelyt suoritettiin Tampereen teknillisen yliopiston systeemitekniikan laitoksella plasmacleaner-laitteella (Pico, Diener Electronic) (kuva 9).



KUVA 9. Diener Electronicin valmistama Pico plasmacleaner (Kuva: Diener electronic GmbH + Co. KG 2009, muokattu) .

Toisessa kokeessa käytettiin voimakkuuksiltaan kahta erilaista käsittelyä (taulukko 9). Kolmannessa kokeessa kaikki happiplasmakäsittelyt tehtiin paremmaksi havaitulla voimakkaammalla käsittelyllä. MEA-alustojen pinnoitus tehtiin välittömästi happiplasmakäsittelyn jälkeen.

TAULUKKO 9. Happiplasmakäsittelyn parametrit.

<u>O₂-plasmakäsittely</u>	<u>Teho</u>	<u>Paine</u>	<u>Aika</u>
1. O ₂ -plasmakäsittely (heikko)	30 W	0,3 mbar	2 minuuttia
2. O ₂ -plasmakäsittely (voimakas)	75 W	0,4 mbar	2 minuuttia

3.2.1 Pinnoitemateriaalien valmistus

Seuraavat pinnoitusmateriaalit valmistettiin itse. Gelatiinin valmistamiseen käytettiin porsaanhosta eristettyä kaupallista valmistetta (Sigma-Aldrich, CAS 9000-70-8). Gelatiinijauheesta valmistettiin 1 % liuos milli-Q-veteen. Liuotus tehtiin 50 °C:n lämpötilassa, kunnes gelatiini oli täysin liuennut. Liuos autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuutin ajan.

0,1 % polyetyleni-iminiliuos (PEI) valmistettiin pipetoimalla 24 µl 50 % PEI-liuosta (Sigma-Aldrich, CAS: 9002-98-6) 12 ml:aan boraattipuskuria. Boraattipuskuri valmistettiin boorihaposta ja natriumtetraboraattiliuoksesta. Valmistettu boraattipuskuri oli boorihapon suhteen 50 mM:sta ja natriumtetraboraatin suhteen 12 mM:sta. Boorihappo (H₃BO₃, Sigma, CAS: 10043-35-3) liuotettiin 100 ml:aan Milli-Q-vettä. Natriumtetraboraatti (B₄Na₂O₇ · 10H₂O, Aldrich, CAS: 1303-96-4) liuotettiin 250 ml:aan Milli-Q-vettä. Liuosta pidettiin magneettisekoituksessa 1,5 tunnin ajan lämpötilaa varovasti nostaten 65 °C:een. Kun liuos oli kirkasta, boorihappo- ja natriumtetraboraattiliuokset yhdistettiin ja pH säädettiin 8,4:een käyttäen 1 N NaOH:ia ja 1 N HCl:ia.

Nitroselluloosan varastoliuos valmistettiin leikkaamalla nitroselluloosakalvosta 0,5 cm²:n suuruinen pala, joka liuotettiin 5 ml:aan 100 % metanolia. Varastoliuoksesta valmistettiin kaksi käyttöliuosta 1:10 (100 µl varastoliuosta ja 900 µl 100 % MeOH:ia) ja 10:1 (900 µl varastoliuosta ja 100 µl 100 % MeOH:ia).

3.2.2 Alustojen pinnoituskäsittelyt

Kaikki pinnoituskäsittelyt tehtiin taulukon 10 ilmoittamilla tilavuuksilla. Kaupallisista pinnoitusreagensseista valmistettiin käyttöliuokset eri formaateille. Taulukkoon 11 ja 12 on eritelty kaupallisten pinnoiteyhdisteiden määrät eri kasvatusalustaformaateilla.

TAULUKKO 10. Pinnoituksessa käytetyt tilavuudet ja alustojen pinta-alat.

<u>Kasvatusalusta</u>	<u>Pohjan pinta-ala (cm²)</u>	<u>Käytetyt tilavuudet (μl)</u>
MEA	3,5	500
MEA (6-kaivo)	0,32	100
48-kuoppalevy	1,1	250
24-kuoppalevy (peitinlasi)	1,8	500
Ibidi	1,0	250

TAULUKKO 11. Laminiinin ja kollageeni IV määrät (μg) eri kasvatusalustoilla.

<u>Kasvatusalusta</u>	<u>Laminiini</u>	<u>Kollageeni IV</u>
μg/cm ²	2,0	10,0
MEA (μg)	7,0	35,0
MEA, 6-kaivoinen (μg)	0,64	3,2
48-kuoppalevy/Ibidi (μg)	2,0	10,0
24-kuoppalevy, peitinlasi (μg)	3,6	18

TAULUKKO 12. Fibronektiinin määrä (μg) eri kasvatusalustoilla.

<u>MEA</u>	<u>MEA</u> <u>(6-kaivoinen)</u>	<u>48-kuoppalevy/</u> <u>Ibidi</u>	<u>24-kuoppalevy</u> <u>(peitinlasi)</u>
5,0 μg	1,0 μg	2,5 μg	5,0 μg
25 μg	5,0 μg	12,5 μg	25 μg

Gelatiinilla pinnoitettuja alustoja inkuboitiin 30 minuutin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen ylimääräinen gelatiini imettiin pois ja angiogeneesimallin solut siirrostettiin välittömästi. MEA-alustojen gelatiinikäsittelyt tehtiin samalla tavalla, mutta ennen käsittelyä alustoja inkuboitiin vasikan sikiöstä eristetyssä seerumissa (FBS, fetal bovine serum) 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. FBS-käsittelyn tarkoitus on alustan pinnan hydrofobisuuden lisääminen, jolloin gelatiini sitoutuu paremmin alustan pintarakenteeseen (Vuo-

renpää ym. 2014, 279). Käsittelyn jälkeen MEA-alustat pestiin steriilillä vedellä kahdesti.

Työssä käytetyn kaupallisen laminiiniliuoksen (Sigma-Aldrich, CAS: 114956-81-9) pitoisuus oli 0,5 mg laminiinia 1 ml:ssa Tris-puskuroitua natriumkloridia. Laminiinista valmistettiin käyttöliuokset eri kasvatusalustoille PBS:aan laimentamalla siten, että laminiinia on 2 µg neliösenttimetriä kohden (taulukko 13). Alustoja inkuboitii 37 °C:ssa kahden tunnin ajan ja pestiin kolmesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS, phosphate balanced salt solution).

TAULUKKO 13. Laminiinin käyttöliuoksien valmistus.

<u>Kasvatusalusta</u>	<u>Pipetoitu tilavuus (µl)</u>	<u>Laimennoksen kokonaistilavuus (µl)</u>	<u>Laimennoksen pitoisuus (µg/ml)</u>
24-kuoppalevy	21,6	1500	7,2
MEA	28,0	1000	14,0
MEA (6-kaivoinen)	3,8	300	8,0
48-kuoppalevy/Ibidi	64,0	4000	6,4

1 mg:sta jauhemaista fibronectiiniä (Sigma-Aldrich) valmistettiin varastoliuos 1 ml:aan magnesiumia ja kalsiumia sisältävään PBS:ään (DPBS). Liuosta säilytettiin + 4 °C:ssa. Ennen käyttöä varastoliuoksesta valmistettiin DPBS:llä laimentamalla pitoisuuksiltaan 10 µg/ml ja 50 µg/ml olevat käyttöliuokset, joista alustoille pipetoitiin taulukon 1 mukaiset tilavuudet. Käytettäessä 10 µg/ml olevaa laimennosta kasvatusalustojen lopulliset kollageenipitoisuudet olivat 1 – 5 µg/cm². 50 µg/ml:n laimennoksella kasvatusalustojen lopullinen kollageenipitoisuus oli 7 – 16 µg/cm². Alustoja inkuboitii 37 °C:ssa tunnin ajan. Ylimääräinen fibronectiini aspiroitiin pois ja solut siirrostettiin välittömästi.

Kollageeni IV -valmiste (Sigma-Aldrich) sulatettiin hitaasti yön yli + 4 °C:ssa. Kollageenipitoisuudeltaan 0,3 mg/ml olevasta liuoksesta valmistettiin sopivat laimennokset (taulukko 14) steriiliin Hank's Balanced Salt Solution -liuokseen (HBSS) siten, että lopullinen pitoisuus kasvatusalustoilla oli 10 µg kollageeniä yhtä neliösenttimetriä kohden. Alustoja inkuboitii 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen kollageeni IV imettiin pois ja alustat pestiin kolmesti steriilillä HBSS:llä.

TAULUKKO 14. Kollageeni IV:n käyttöliuosten valmistus.

<u>Kasvatusalusta</u>	<u>Valmistetta</u> <u>pipetoitu (µl)</u>	<u>Laimennoksen</u> <u>pitoisuus (µg/ml)</u>
24-kuoppalevy	120	36
MEA	233	70
48-kuoppalevy/Ibidi	133	40

PEI-liuosta pipetoitiin kasvatusalustoille taulukon 10 mukaiset tilavuudet ja inkuboitiin yön yli +4 °C:ssa. PEI-liuos poistettiin ja alustoja huuhdeltiin neljä kertaa steriilillä Milli-Q-vedellä. Alustojen annettiin kuivua, minkä jälkeen niitä steriloitiin UV-valolla yhden tunnin ajan. Osaan PEI-liuksella käsitellyistä kaivoista lisättiin ennen pesuja tippa hASC-kasvatusmediumiin laimennettua steriiliä laminiinia (20 µg laminiinia/l) ja annettiin kuivua 30 minuutin ajan huoneenlämmössä ennen solujen siirrostamista. Nitroselluloosaa pipetoitiin kasvatusalustoille taulukon 10 osoittamat tilavuudet. Liuos imettiin pois aspiraatioimulla ja annettiin kuivua ennen solujen siirrostamista.

3.3 MEA-mittaukset

MEA-mittaukset suoritettiin hESC-sydänmallilla 7 vuorokauden kuluttua sydänlihassolujen siirrostuksesta. iPS-sydänmallilla mittaukset tehtiin 8 vuorokauden kuluttua. Mittauksissa käytettiin MultiChannel Systemsin MEA2100:aa, jossa oli Inv –BC – vahvistin. Data kerättiin 20 kHz:n taajuudella ja käsiteltiin MultiChannel Systemsin MC_Rack-ohjelmalla. Näytettä pidettiin 37 °C:n lämpötilassa vahvistimen lämmittimen (PT100) avulla. Näytteet pidettiin steriilinä mittauksen aikana kaasuja läpäisevän kalvon avulla.

3.4 Immunofluoresenssivärjäykset

Solujen viljelyajat värjäyksen alkaessa vaihtelivat eri pinnoituskokeissa. hESC-kardiomyosyyttejä sisältävät solumallit fiksattiin 13. päivänä ja iPS-kardiomyosyyttejä sisältävät solumallit 15. päivänä sydänlihassolujen siirrostuksesta. Taulukkoon 15 on listattu eri formaateilla käytetyt liuostilavuudet. Värjäysvaiheet käsitellään taulukossa

16. Pinnoituskokeiden viljelyajat alkaen angiogeneesimallin kokoamisesta on esitetty taulukossa 17. Kaikki värjäyksessä käytetyt reagenssit on listattu liitteessä 2.

Ennen solujen fiksausta kasvatusliuos imettiin pois ja solut pestiin kolmesti PBS-liuoksella. Yhden pesun kesto oli 5 minuuttia. Kaivot imettiin kuiviksi ja solut fiksoitiin kasvatusalustaan 4 % paraformaldehydillä (PFA) käyttämällä taulukon 15 osoittamia tilavuuksia. Soluja inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuutin ajan. Fiksauksen jälkeen solut pestiin kolme kertaa PBS-liuoksella kuten edellä. Fiksattuja soluja säilytettiin + 4 °C:ssa valolta suojattuna enimmillään 7 viikkoa.

Ennen primäärivasta-aineiden lisäämistä kaivot tyhjennettiin ja soluja inkuboitiin huoneenlämmössä 0,5 % TritonX-100-liuoksessa 15 minuutin ajan läpäisevän solukalvon aikaansaamiseksi. Käsittelyn jälkeen soluja pestiin kolmesti viiden minuutin ajan PBS-liuoksella. Epäspesifinen sitoutuminen estettiin inkuboimalla soluja 10 % BSA-liuoksessa huoneenlämmössä 20 minuutin ajan.

Primäärivasta-aineista valmistettiin sopivat laimennokset 1 % BSA-liuokseen (taulukko 18). Soluja inkuboitiin yön yli + 4 °C:ssa ja pestiin kolmesti 5 minuutin ajan PBS-liuoksella. Sekundäärivasta-ainelaimennokset valmistettiin laimentamalla 1 % BSA-liuokseen (taulukko 19). Soluja inkuboitiin valolta suojattuna 45 minuutin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen soluja pestiin PBS:llä kolmesti viiden minuutin ajan. Osalle soluista tehtiin DAPI tumavärjäys. Solut jätettiin kolmanteen pesuliuokseen ja säilytettiin valolta suojattuna + 4 °C:ssa.

TAULUKKO 15. Käsittelyiden liuostilavuudet eri viljelyformaateilla.

<u>Formaatti</u>	<u>Pesut ja fiksaus</u>	<u>TritonX-100 ja BSA-käsittelyt</u>	<u>Vasta-aineliuokset</u>
MEA (standardi)	1,0 ml	500 µl	500 µl
MEA (6-kaivoinen)	300 µl	120 µl	120 µl
48-kuoppalevy	500 µl	120 µl	120 µl
24-kuoppalevy (peitinlasit)	1,0 ml	300 µl	300 µl
Ibidi	300 µl	120 µl	120 µl

TAULUKKO 16. Fluoresenssivärjäyksen vaiheet.

<u>Vaihe</u>	<u>Toisto</u>	<u>Inkubaatioaika</u>
Pesu (PBS)	3	5 minuuttia/pesu (RT)
4 % PFA:lla fiksaaminen	1	20 minuuttia (RT)
Pesu (PBS)	3	5 minuuttia/pesu (RT)
Triton X-100 -käsittely	1	15 minuuttia (RT)
Pesu (PBS)	3	5 minuuttia/pesu (RT)
10 % BSA -käsittely	1	30 minuuttia (RT)
Primäärivasta-ainevärjäys	1	1 h (RT) tai yön yli (+ 4 °C)
Pesu (PBS)	3	5 minuuttia/pesu (RT)
Sekundäärivasta-ainevärjäys	1	40 minuuttia (RT), pimeässä
Pesu (PBS)	3	5 minuuttia/pesu (RT), pimeässä

TAULUKKO 17. Solumallin viljelyaika fiksauksen alkaessa.

<u>Pinnoituskoee</u>	<u>Viljelyaika</u>
1.	7 vuorokautta
2.	16 vuorokautta
3.	18 vuorokautta

TAULUKKO 18. Käytetyt primäärivasta-aineet.

<u>Vasta-aine</u>	<u>Alkuperä</u>	<u>Laimennuskerroin</u>	<u>Toimittaja</u>
anti-human Von Willebrand Factor	Kani	1:100	Sigma
anti-human Collagen IV	Hiiri	1:500	Sigma
anti-human cardiac Troponin T	Vuohi	1:1500	Abcam
Anti-human Actin	Hiiri	1:1500	IBT

TAULUKKO 19. Käytetyt sekundäärivasta-aineet.

<u>Vasta-aine</u>	<u>Laimennuskerroin</u>	<u>Toimittaja</u>
anti-mouse IgG FITC	1:100	Sigma
anti-rabbit IgG TRITC	1:100	Sigma
anti-goat Alexa Fluor 568	1:800	Life Technologies

4 TYÖN TULOKSET

PEI- ja nitroselluloosapinnoitetuilla alustoilla solut kasaantuivat rypäsmäisiksi rakenteiksi jo varhaisessa vaiheessa, joten ensimmäisen pinnoituskokeen tulosten perusteella polyetyleni-iminiä ja nitroselluloosaa ei valittu muihin pinnoituskokeisiin niiden heikon soveltuvuuden vuoksi. Tämän vuoksi PEI- ja nitroselluloosapinnoitteita ei ole käsitelty tulososiossa.

4.1 Sydänlihassolujen morfologia

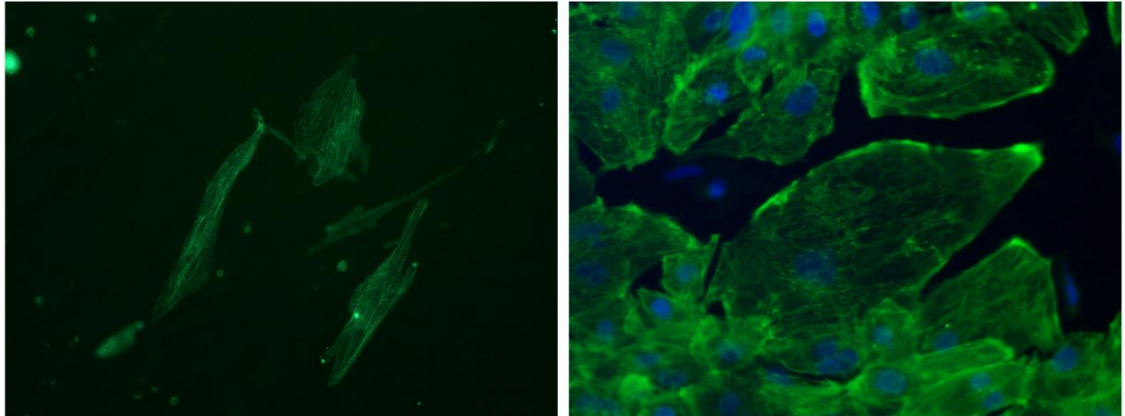
hESC-kardiomyosyyttien morfologiaa arvioitiin neljän päivän kuluttua solujen siirrostuksesta. Kardiomyosyytit olivat alkaneet sykkiä, mutta sykintä oli epäsynkronista ja harvaa. Sekä standardi- että kuusikaivoisella MEA:lla kasvavat kardiomyosyytit olivat kerääntyneet sykkiviksi, rypäsmäisiksi kasvustoiksi, jotka olivat alkaneet irtoilla reunoiltaan alustasta. 48-kuoppalevyllä havaittiin tasaista kasvustoa sekä rakenteeltaan pitkiä ja maturoitunneen muodon omaavia kardiomyosyyttejä. Kypsymättömät solut olivat rakenteeltaan kulmikkaita.

iPS-kardiomyosyyttien morfologiaa tarkasteltiin kahdeksantena päivänä siirrostuksesta. Kuusikaivoisen MEA:n iPS-kontrollin sydänlihassolut sykkivät hyvin ja alustan kasvusto oli melko tasainen. Angiogeneesimallin sisältävissä, kollageenillä pinnoitetuissa kaivoissa havaittiin heikkoa sykintää. Fibronektiini- ja laminiinipinnoitteisten kuoppien solujen ei havaittu sykkivän.

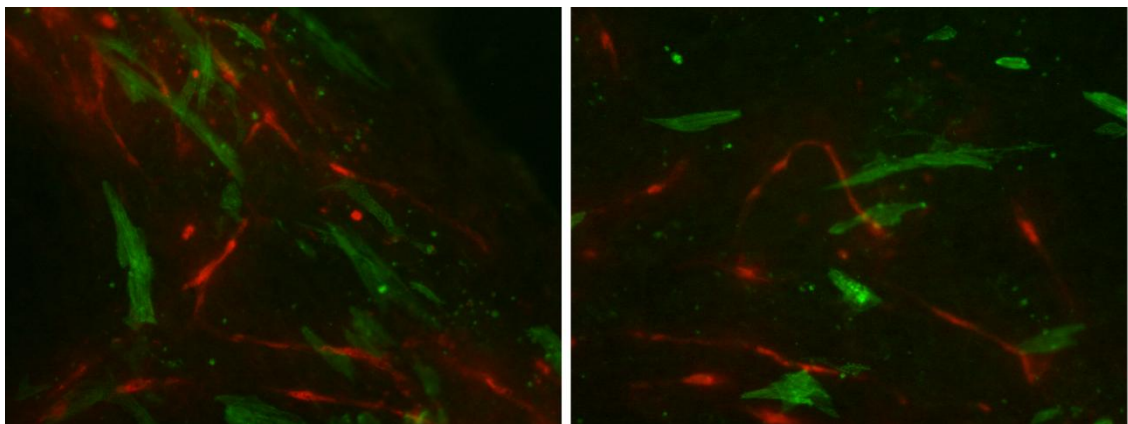
Verrattuna angiogeneesimallin päällä kasvaviin iPS-kardiomyosyytteihin, iPS-kontrollikuopissa kasvavien solujen sykintä oli synkronisempaa ja tasaisempaa kaikilla alustaformaateilla. Ibidi-levyillä myös angiogeneesimallin päällä kasvavat sydänlihassolut sykkivät synkronisesti ja kasvusto oli tasaista. Sama havaittiin myös hESC-solujen yhteydessä.

Sydänlihassolujen morfologiaa tarkasteltiin fluoresenssivärjäyksen avulla. 48-kuoppalevyllä viljeltyjen hESC-kardiomyosyyttien värjäystulokset on esitetty kuvassa 10. Kuvassa 11 on kollageenilla ja laminiinilla pinnoitetulla 48-kuoppalevyllä kasvavia

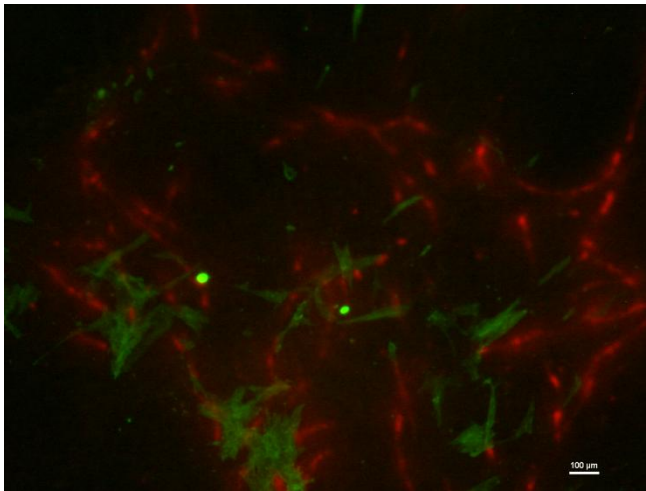
hESC-kardiomyosyyttejä. Kuva 12 havainnollistaa angiogeneesimallin päällä kasvavien hESC-kardiomyosyyttien morfologiaa fibronektiinilla pinnoitetulla peitinlasilla. Kuvassa 13 on angiogeneesimallin päällä kasvavia iPS-kardiomyosyyttejä laminiinipinnoitteisella 48-kuoppalevyllä. Kuvassa 14 iPS-kardiomyosyytit kasvavat ilman angiogeneesimallia fibronektiinipäällysteisellä 48-kuoppalevyllä.



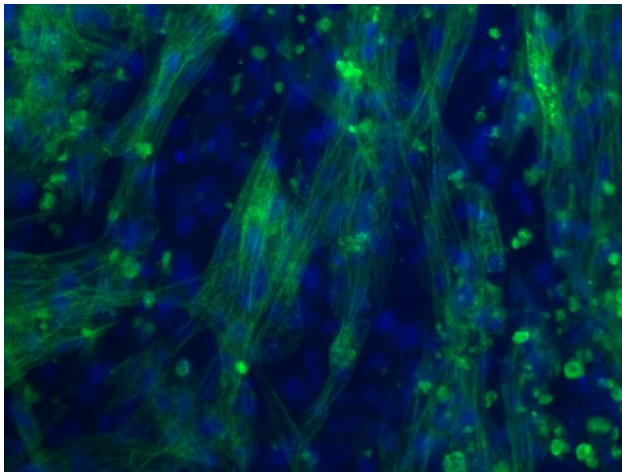
KUVA 10. Vasemmalla fluoresenssivärjättyjä hESC-kardiomyosyyttejä angiogeneesimallin päällä fibronektiinipinnoitetulla 48-kuoppalevyllä. Oikealla hESC-kardiomyosyyttejä ilman angiogeneesimallia fibronektiinipinnoitetulla 48-kuoppalevyllä. Vihreä väri ilmentää aktiinia ja sininen DNA:ta.



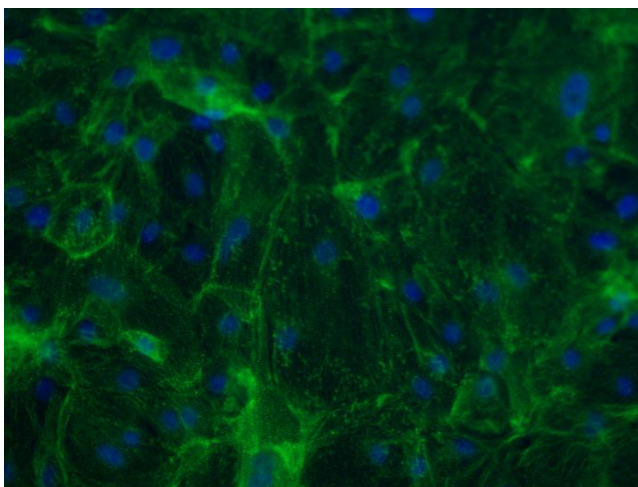
KUVA 11. Angiogeneesimallin päällä kasvavia hESC-kardiomyosyyttejä 48-kuoppalevyllä. Vasemmalla kollageeni IV - ja oikealla laminiinipinnoitus. hESC-kardiomyosyytit näkyvät vihreänä ja verisuonimaiset rakenteet punaisena.



KUVA 12. Angiogeneesimallin päällä kasvavia hESC-kardiomyosyyttejä fibronektiinipinnoitetulla 24-kuoppalevyllä.



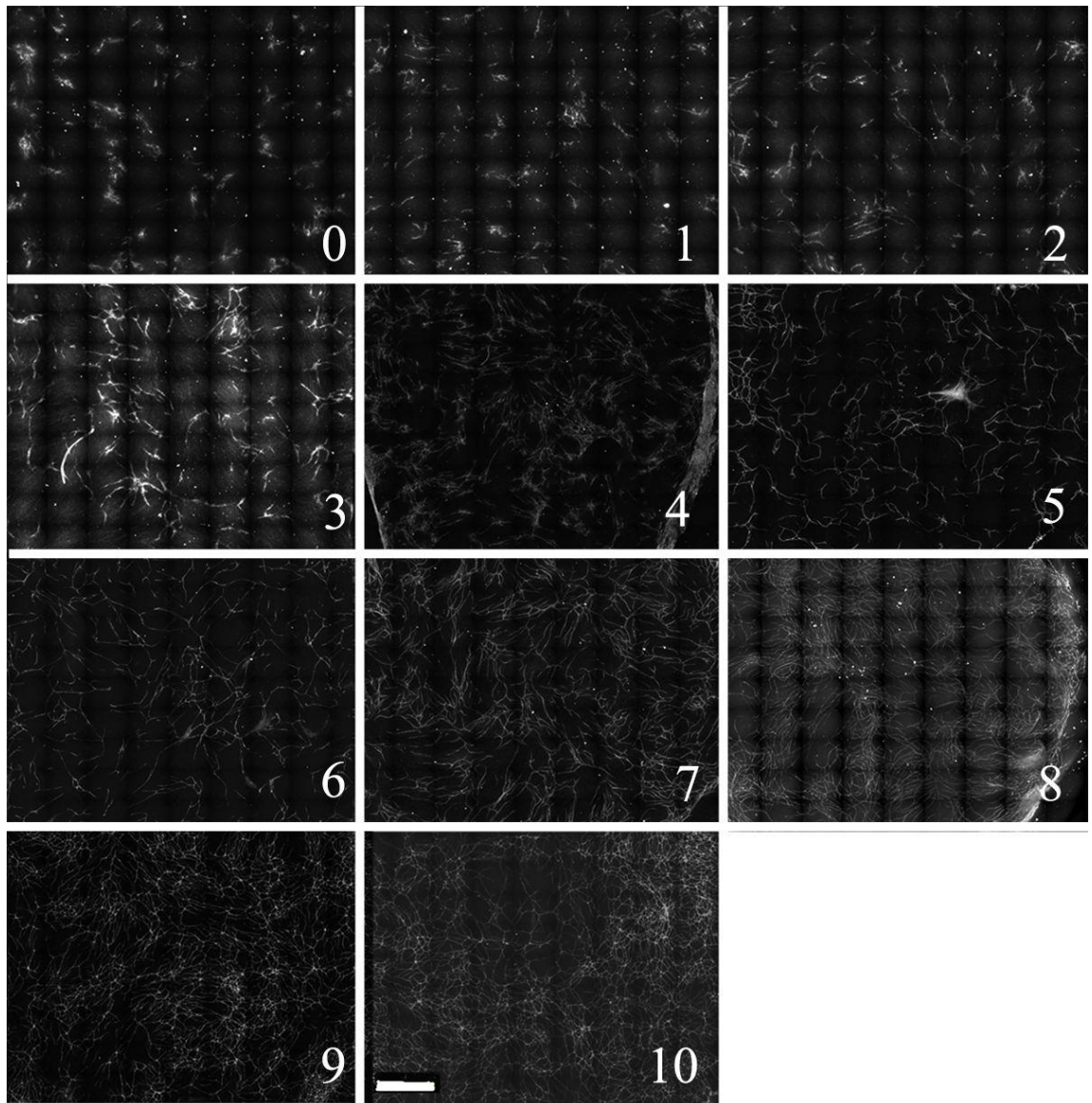
KUVA 13. Angiogeneesimallin päällä kasvavia iPS-kardiomyosyyttejä laminiinilla pinnoitetulla 48-kuoppalevyllä.



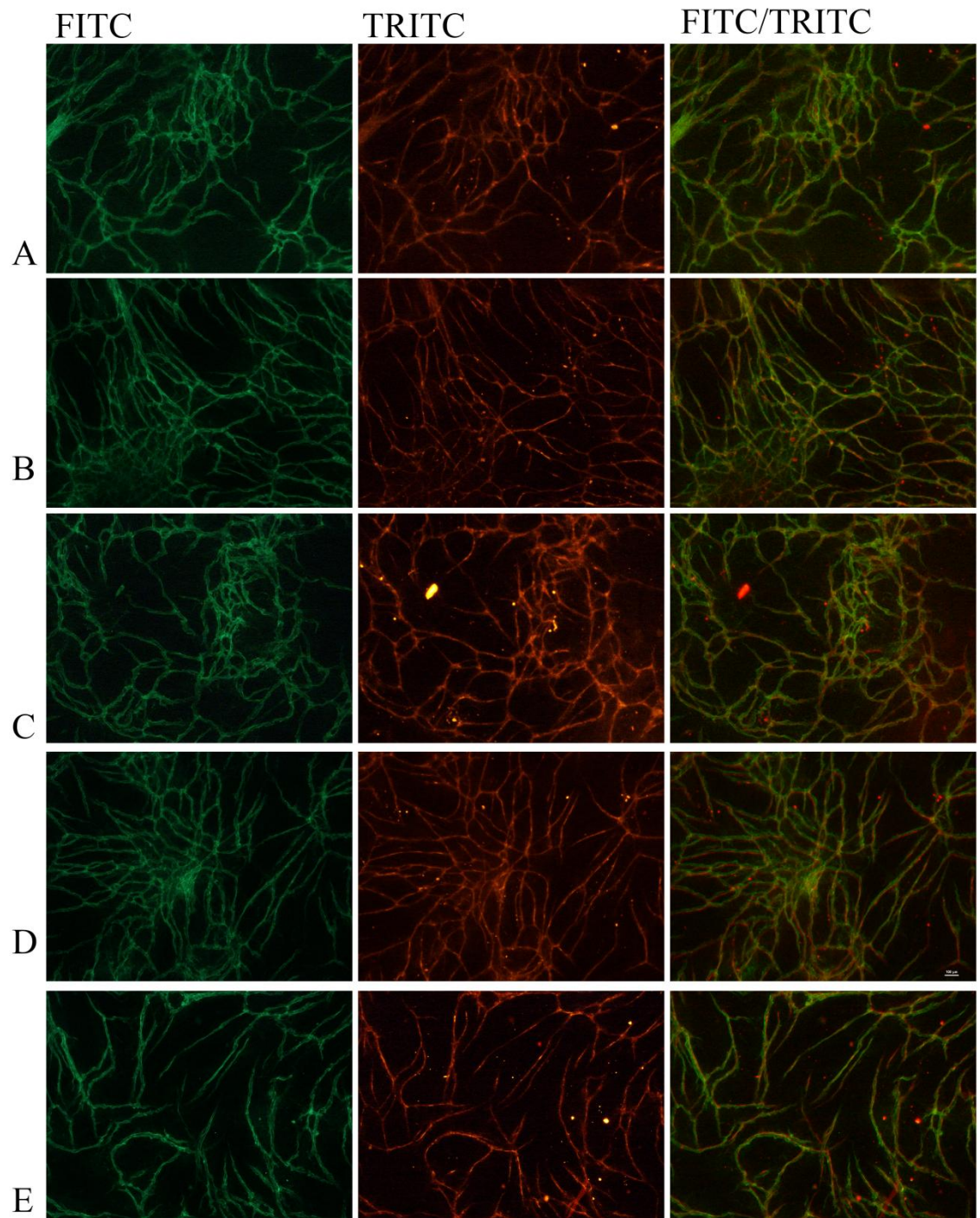
KUVA 14. iPS-kardiomyosyyttejä fibronektiinipinnoitetulla 48-kuoppalevyllä.

4.2 Verisuonten muodostus

Verisuonten muodostusta vertailtiin pinnoitemateriaalien päällä eri alustaformaateilla. Visuaaliseen arviointiin käytettiin FICAM:ssa kehitettyä (Huttala 2012, 52) skaalausjärjestelmää (kuva 15). Skaalaus tehtiin asteikolla 0 – 10, missä verisuonirakenteiden määrää arvioitiin seuraavasti: 0 = ei ollenkaan, 1 – 3 = heikosti, 4 – 6 = kesinkertaisesti, 7 – 8 = paljon ja 9 – 10 = erittäin paljon verisuonirakenteita. Kuvassa 16 näkyy verisuonirakenteiden muodostus eri pinnoitusmateriaaleilla 48-kuoppalevyllä. Taulukko 20 sisältää yhteenvedon visuaalisista havainnoista kaikilla formaateilla.



KUVA 15. Skaalausasteikko 0-10. (Kuva: Huttala 2012, 52).

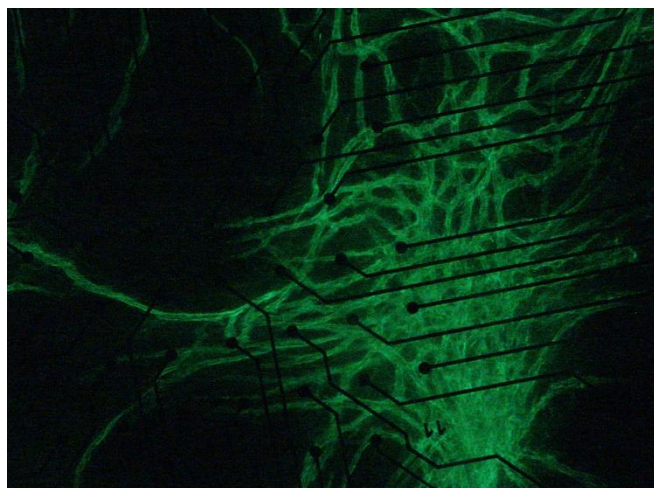


KUVA 16. Verisuonirakenteiden muodostus 48-kuoppalevyllä. Pinnoitusaineet kuvas-
sa: A) Lamiiniini, B) Fibronektiini (10 ug/ml), C) Kollageeni IV, D) Gelatiini (itse val-
mistettu) ja E) Gelatiini (IBT).

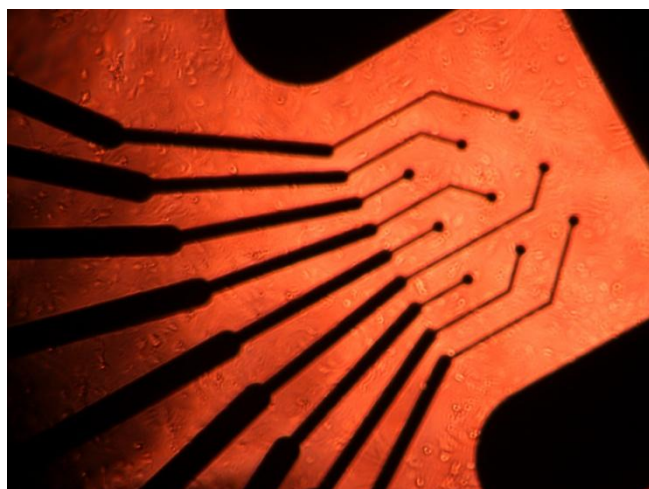
TAULUKKO 20. Verisuonirakenteiden määrä asteikolla 0 – 10 eri formaateilla.

<u>Kasvatusalusta</u>	<u>Laminiini</u>	<u>Fibronectiini</u>	<u>Kollageeni IV</u>	<u>Gelatiini</u> <u>(oma)</u>	<u>Gelatiini</u> <u>(IBT)</u>
48-kuoppalevy	6	7	4	4	4
24-kuoppalevy	6	4	6	4	4
Ibidi	6	6	5	4	4
MEA	-	5	4	3	5
MEA (6-kaivo)	5	5	4	3	4

Kuvassa 17 on verisuonirakenteita standardikokoisella MEA:lla. Kuva 18 on faasimikroskooppikuva kuusikaivoisella MEA:lla kasvavista angiogeneesimallin soluista.



KUVA 17. Verisuonirakenteita fibronectiinipäällysteisellä standardi-MEA:lla.



KUVA 18. 6-kaivoisen MEA:n reunoilla kasvavia soluja.

4.3 Sydänmallin kiinnittyminen

4.3.1 Angiogeneesimalli ennen sydänlihassolujen siirrostusta

Plasmakäsittelyn tehokkuutta arvioitiin toisessa pinnoituskokeessa kaksi vuorokautta angiogeneesimallin kokoamisen jälkeen ennen kardiomyosyyttien siirrostamista. Taulukko 21 sisältää yhteenvedon havainnoista kuusikaivolisilla MEA-alustoilla eri pinnoitemateriaalien kesken.

TAULUKKO 21. Angiogeneesimalli kuusikaivolisella MEA:lla.

<u>Pinnoitemateriaali</u>	<u>Happiplasmakäsittely</u>	<u>Arvio</u>
Fibronectiini	Voimakas	Hyvin verisuonirakenteita, mutta sisälsi solutyhjiä alueita
Laminiini	Voimakas	Rakenteita kohtalaisesti osassa kuopista, mutta sisälsi myös solutyhjiä alueita.
Kollageeni IV	Voimakas	Rakenteita kohtalaisesti osassa kuopista, mutta sisälsi myös solutyhjiä alueita.
Ei pinnoitetta	Voimakas	Verisuonirakenteita alustan reunoilla. Ei kasoja, mutta myös tyhjiä alueita.

Taulukko 22 sisältää yhteenvedon havainnoista standardi-MEA-alustoilla. Tuloksia arvioitiin skaalausasteikolla 0 – 4 seuraavasti: 0 = solut ovat täysin irronneina, 1 = solut ovat osittain irti ja verisuonirakenteita on huonosti, 2 = kuroumia esiintyy, mutta verisuonirakenteita löytyy kohtalaisesti, 3 = kuroumia on vähän ja verisuonirakenteita löytyy hyvin, 4 = solut ovat täysin kiinni ja verisuonirakenteita löytyy hyvin.

TAULUKKO 22. Angiogeneesimalli standardi-MEA:lla vuorokausi ennen hESC-kardiomyosyyttien siirrostusta.

<u>Pinnoite</u>	<u>Heikko käsittely</u>	<u>Vahva käsittely</u>	<u>Ei käsittelyä</u>
Fibronectiini	2	4	1
Gelatiini	-	2	1
Laminiini	2	-	0
Kollageeni IV	-	1	0

4.3.2 hESC-sydänlihassolut

Neljäntenä päivänä hESC-kardiomyosyyttien siirrostuksesta eri solumääriä sisältävien kuoppien ja pinnoitemateriaalien välillä ei havaittu laadullista eroa MEA-alustoilla. Solut olivat kerääntyneet alustojen reunoille sekä standardi- että kuusikaivoisilla MEA-alustoilla. Happiplasmakäsiteltujen ja -käsittelemättömien alustojen kasvuston kiinnittymisessä ei myöskään havaittu eroa tässä vaiheessa. Muilla kasvatusformaateilla solumalleja viljeltiin 13 vuorokautta kardiomyosyyttien siirrostuksesta. 48-kuoppalevyllä solumalli pysyi parhaiten kiinni alustassaan ja toivotunlaisia rakenteita esiintyi. Fibronektiini-, laminiini- ja gelatiinipinnoitteet toimivat parhaiten 48-kuoppalevyllä.

4.3.3 iPS-sydänlihassolut

Sydänmallin kiinnittymistä arvioitiin kuudentena ja kahdeksantena päivänä iPS-kardiomyosyyttien siirrostuksesta. Taulukkoon 23 on koottu mikroskopointihavaintoja kuusikaivoisilta MEA-alustoilta 8 vuorokautta sydänlihassolujen siirrostuksesta. Standardikokoisia MEA-alustoja ei käytetty kolmannessa pinnoituskokeessa.

TAULUKKO 23. Mikroskopointihavainnot 6-kaivoiselta MEA:lta.

<u>iPS-kontrolli</u>	<u>Fibronektiini</u>	<u>Laminiini</u>	<u>Kollageeni IV</u>
Solut sykkivät hyvin.	Ei sykintää.	Ei sykintää.	Heikkoa sykintää.
Kasvusto konfluentti.	Solut kasautuneet.	Solut kasautuneet.	Solut kasautuneet.

Sydänmallia viljeltiin 48-kuoppalevyllä, peitinlaseilla ja ibidi-alustoilla 15 vuorokautta kardiomyosyyttien siirrostuksesta. Solumalli oli hyvin kiinni kuudentena ja kahdeksantena päivänä ja solut sykkivät hieman paremmin kuin MEA-alustoilla.

4.3.4 Solumäärän vaikutus

Angiogeneesimallin päällä kasvatettuna kardiomyosyyttien viljelytiheydellä ei havaittu olevan vaikutusta sydänmallin toimivuuteen. Sen sijaan pelkkiä kardiomyosyyttejä sisältävissä kontrollikuopissa havaittiin eroja eri solumäärien välillä. Solujen sykintä oli

sitä voimakkaampaa ja synkronisempaa, mitä suuremmalla tiheydellä solut oli siirrostettu.

4.4 Micro electrode array -mittaukset

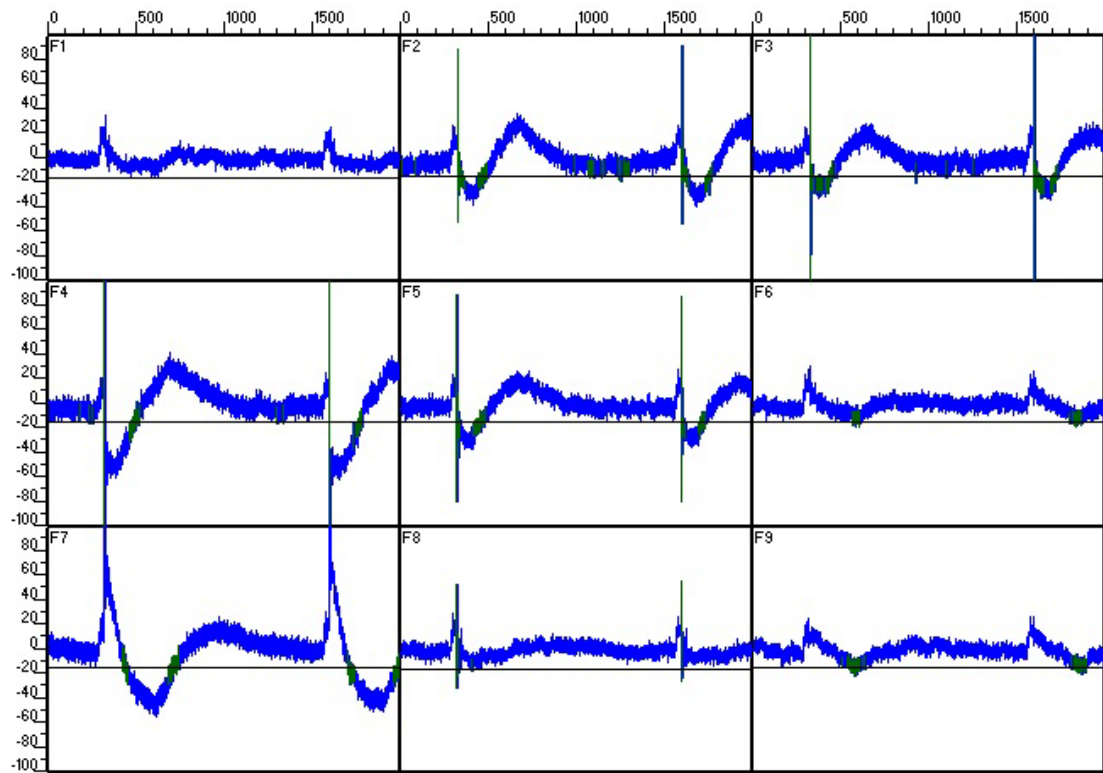
Happiplasmakäsitellyiltä kuusikaivoisilta MEA-alustoilta tarkasteltiin sykkivien iPS- ja hESC-kardiomyosyyttien määrää ja sijaintia suhteessa alustan elektrodeihin MEA-mittauksia varten 6 ja 8 vuorokauden kuluttua sydänlihassolujen siirrostuksesta. Havainnot on koottu taulukkoon 24.

TAULUKKO 24. Sydänmallin kiinnittyminen kuusikaivoisella MEA-alustalla.

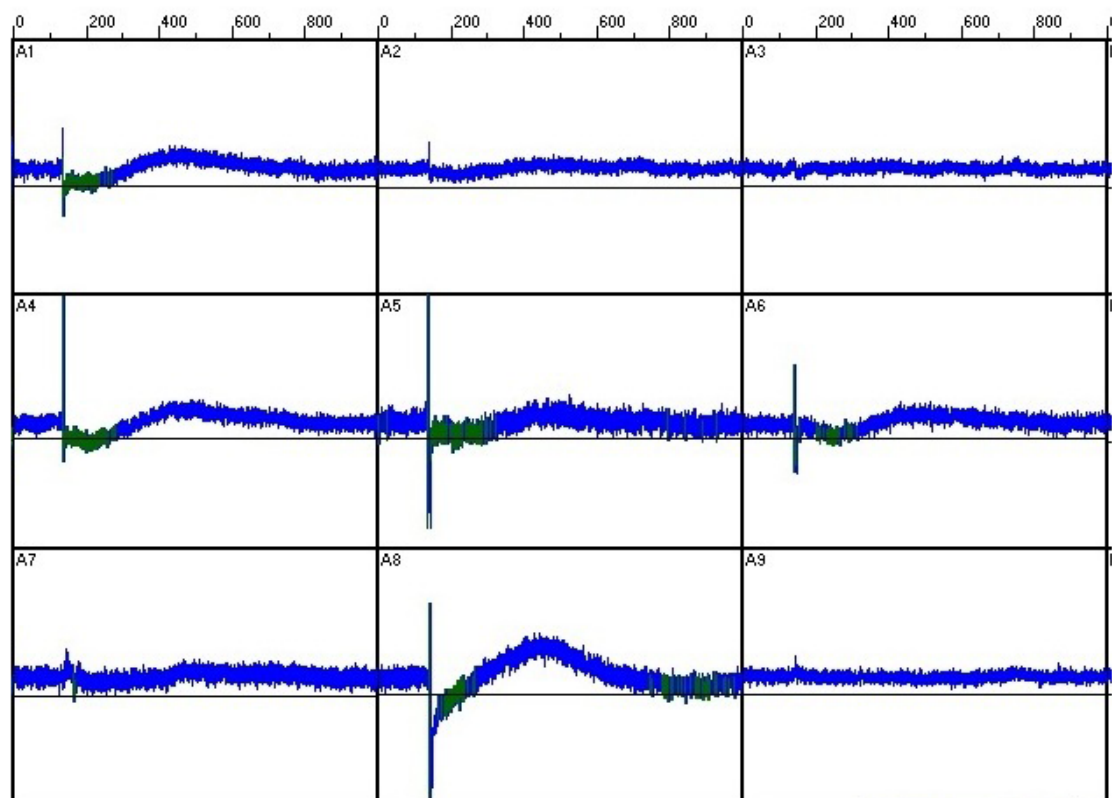
<u>Solut</u>	<u>Päivä</u>	<u>Fibronectiini</u>	<u>Laminiini</u>	<u>Kollageeni IV</u>	<u>Kardiomyosyyttikontrolli</u>
iPS	6. päivä	Mitattavissa	Mitattavissa	Mitattavissa	Mitattavissa
iPS	8. päivä	Ei signaalia	Ei signaalia	Mitattavissa	Mitattavissa
hESC	8. päivä	Ei signaalia	Ei signaalia	Ei signaalia	-

Kuvissa 14 ja 15 näkyvä signaali on saatu kuusikaivoisilta MEA-alustoilta. Kuvassa 19 on pelkkiä iPS-kardiomyosyyttejä sisältävästä kontrollikaivosta saatu signaali. Kuvan 20 signaali on peräisin angiogeenesimallin päällä kasvavista iPS-kardiomyosyyteistä.

Yksi ruutu näyttää yksittäisen kaivon yhden elektrodin vastaanottamaa sykettä. Elektrodit on numeroitu 1 – 9:ään. X-akseli mittaa sykinnän taajuutta. Kuvassa 19 näkyy elektrodin antama signaali kahden sekunnin ajalta, ja kuvassa 20 ajaksi on määritetty yksi sekunti. Y-akselilla näkyy sykinnän voimakkuus, jonka raja-arvoiksi on määritelty +/- 100 μ V.



KUVA 19. iPS-kontrollikuopasta saatu signaali.



KUVA 20. Angiogeneesimallin päällä kasvavista iPS-kardiomyosyyteistä saatu signaali.

5 POHDINTA

Ensimmäisen pinnoituskokeen aikana havaittiin, etteivät polyetyleni-imini- ja nitroselluloosapinnoitteet ole sydänmallin kanssa toimivia pinnoitusmateriaaleja. Varsinkin MEA-alustoilla solut kerääntyivät irtoileviksi kasoiksi ja verisuonirakenteita muodostui heikosti. Kirjallisuuden (Egert & Meyer 2005, 432–453) mukaan nitroselluloosa- ja PEI-pinnoitteita on käytetty onnistuneesti lasisten kasvatusalustojen pinnoitukseen. Molemmat yhdisteet muodostavat sidoksia solujen pintamolekyylien kanssa, mutta PEI:n muodostama tasainen kerros irtoaa nestevirtauksien vaikutuksesta herkemmin kuin nitroselluloosa. Fibronektiinilla, gelatiinilla, laminiinilla ja kollageeni IV:lla havaittiin kohtalaisen neutraali vaikutus verisuonirakenteiden muodostumiseen. Alustaformaattista riippumatta parhaimmiksi osoittautuivat fibronektiini ja laminiini. Erot kyvyssä tukea verisuonirakenteiden muodostumista eivät kuitenkaan olleet kovin suuria eri pinnoitemateriaalien välillä.

Happiplasmakäsittelyn vaikutusta solumallin pysyvyyteen arvioitiin 2. pinnoituskokeen yhteydessä. Vaikutus havaittiin selkeimmin ennen hESC-kardiomyosyyttien siirrostusta, jolloin tehtyjen mikroskopointien perusteella fibronektiinillä pinnoitetuilla standardi-MEA-alustoilla vahvempi happiplasmakäsittely toimi parhaiten. Alustalla ei havaittu solukasoja, kun taas heikosti happiplasmakäsitellyllä alustalla oli solukasoja ja myös kuroutumia. Molemmilla alustoilla havaittiin verisuonirakenteita. Fibronektiinipinnoitetulla alustalla, jolle ei tehty happiplasmakäsittelyä, havaittiin enemmän kuroutumia ja solukasoja, mutta myös verisuonirakenteita.

Kun verrattiin heikosti plasmakäsiteltäviä fibronektiini- ja lamiinipinnoitettuja standardialustoja keskenään, laminiinipinnoite arvioitiin verisuonirakenteiden määrän ja kiinnittymisen perusteella paremmaksi vaihtoehdoksi. Laminiinipinnoitetulla alustalla, jolle ei tehty happiplasmakäsittelyä, solut olivat täysin irronneita eikä verisuonirakenteita havaittu ollenkaan. Myös kollageenipinnoitetulla alustalla voimakkaalla happiplasmakäsitellyllä havaittiin olevan vaikutusta solujen kiinnittymiseen. Happiplasmakäsitellyllä alustalla havaittiin verisuonirakenteita, mutta myös kuroutumia ja kasaumia. Alustalla, jota ei ollut happiplasmakäsiteltä, solut olivat täysin irronneet. Gelatiinipinnoitetulla standardi-MEA-alustalla happiplasmakäsittelyn vaikutus solumallin pysyvyyteen oli heikompi. Gelatiini oli testatuista pinnoiteyhdisteistä edullisin vaihtoehto, mikä puoltaa sen

käyttöä jatkossa. Happiplasmakäsittelyllä pääteltiin testien perusteella olevan positiivinen vaikutus solumallin kiinnittymiseen MEA-alustoilla, mutta vaikutus oli lyhytaikainen, n. 4 vuorokautta. Muille alustoille happiplasmakäsittelyä ei tehty.

Kolmannessa pinnoituskokeessa havaittiin laminiinin toimivan parhaiten peitinlaseilla ja 48-kuoppalevyllä: solut kasvoivat angiogeneesiallin päällä tasaisesti ja sykkivät synkronisesti. Ibidi-levyillä laminiinin lisäksi fibronektiinipinnoitus vaikutti edesauttavan edelläkuvatuslaista lopputulosta. Kuitenkin sekä 48-kuoppalevyllä että peitinlaseilla sykkinnän tiheys ja synkronisuus havaittiin selkeästi paremmaksi kuopissa, joissa oli pelkkiä iPS-kardiomyosyyttejä verrattuna angiogeneesimallin päällä kasvaviin iPS-kardiomyosyytteihin. Laminiini- ja fibronektiinipinnoitetuilla ibidi-levyillä myös angiogeneesimallin päällä kasvavat sydänlihassolut olivat sykkinnän ja solukasvustoalueiden laajuuden suhteen toivontunlaisia.

MEA-alustat olivat odotetusti haasteellisin kasvatusalusta johtuen alustan pinnan muotoon vaikuttavista teknisistä komponenteista sekä niiden kiinnitykseen käytettävistä yhdisteistä. Pelkillä angiogeneesimallin soluilla (pinnoituskoe 1.) verisuonirakenteita muodostui MEA-alustoille hyvin, mutta solut eivät jakaantuneet alustoille tasaisesti vaan kerääntyvän kaivon reunoille, mikä havaittiin myös muissa kokeissa. Sydänmallin solut irtosivat MEA-alustoilta herkemmin kuin muilla alustaformaateilla. Lisäksi solut kerääntyivät säännönmukaisesti alustojen reunaosiin, vaikka siirrostuksen aikana pyrittiin saamaan solut levittäytymään tasaisesti.

Koska MEA-alustojen elektrodit sijaitsevat kasvatusalustan keskiosassa, reunoille haakeutuminen hankaloitti MEA-mittauksen tekoa. Reunoilla kasvaessaan sydänlihassolut olivat usein kerääntyneet rypäsmäisiksi kasoiksi ja sykkivät voimakkaasti, mutta viljelyalustan keskiosassa harvakseltaan kasvavat solut sykkivät heikommin. Elektrodien läheisyydessä kasvavista hESC-kardiomyosyyteistä ei onnistuttu saamaan signaalia MEA-mittauksissa. Myös iPS-sydänlihassolujen sykintä oli odotettua heikompa.

MEA-mittauksien toteuttamiseen liittyvänä haasteena on mittausolosuhteiden vakioiminen. Signaalin voimakkuuteen ja muotoon vaikuttavia tekijöitä ovat läheisyydessä sijaitsevat sähkökenttää muuttavat laitteet sekä lämpötilan, pH:n ja osmolaalisuuden vaihtelut. Häiriöiden minimoimiseksi solujen olisi sijaittava elektrodien välittömässä läheisyydessä. (Blau 2013, 485.) MEA-alustoille ei onnistuttu saamaan tasaista kasvustoa.

iPS-kontrollikaivossa, jossa ei ollut angiogeneesimallia, sydänlihassolut antoivat voimakkaamman signaalin ja sykintä oli lähellä odotusarvoa (1/s). Angiogeneesimallin päällä kasvavat iPS-kardiomyosyytit sykkivät mittausten mukaan myös kerran sekunnissa. iPS-kontrollin signaalin muoto oli selkeämpi verrattuna angiogeneesimallin päällä kasvavilta soluilta vastaanotettuun signaaliin. Erot johtuvat todennäköisesti angiogeneesimallin solukerroksien vaimentavasta vaikutuksesta.

Kardiomyosyyttien tiheydellä tiedettiin olevan vaikutusta sykkinnän synkronisuuteen. Aiemmissa sydänmallitutkimuksissa on käytetty suurempia kardiomyosyyttitiheyksiä ($0,1 - 0,4 \times 10^6$ s/cm²) (Vuorenää ym. 2014, 78). Tässä tutkimuksessa havaittiin, että kontrolleina toimivat sydänlihassolujen yksisoluviljelmät (sekä hESC että iPS) olivat sykkinnältään parempia kuin yhteisviljelmässä angiogeneesimallin kanssa. Tästä johtuen sydänlihassolujen lukumäärän vaikutusta sykkinnän voimakkuuteen ja kestoon ei kyetty arvioimaan yhteisviljelmässä. Sen sijaan yksisoluviljelmässä sydänlihassolujen lukumäärällä oli vaikutusta solujen sykkinnän synkronisuuteen ja voimakkuuteen. Tämän pääteltiin johtuvan siitä, että solut kykenevät muodostamaan paremmin solu-solu kontakteja viljelmässä, jossa on runsaammin soluja (Laizzo 2009, 65, 125).

Verisuonimuodostuksen havaittiin heikkenevän yhteisviljelmässä sydänlihassolujen kanssa. Opinnäytetyön jälkeen tehdyssä mediumtestissä tutkittiin hESC-kasvatusliuoksen vaikutusta verisuonirakenteiden muodostumiseen. Käytettäessä hESC-mediumia verisuonirakenteita muodostui kohtalaisesti angiogeneesimallille optimoituun HUVEC-mediumiin verrattuna. Verisuonirakenteiden vähäisyyden ja heikon laadun arveltiin siten johtuvan muista tekijöistä hESC-kardiomyosyyttejä sisältäneen sydänmallin osalta. Kolmannessa pinnoituskokeessa, iPS-kardiomyosyyttien yhteydessä, oli verisuonirakenteiden muodostuminen sekä määrällisesti että laadullisesti heikointa. iPS-kardiomyosyyttien kasvatusliuoksen vaikutusta verisuonirakenteiden heikkouteen ei voida arvioida, koska Cellular Dynamics Internationalin valmistaman iPS-kardiomyosyyttien kasvatusliuoksen tarkasta sisällöstä ei ole saatavilla tietoa, eikä iPS-kardiomyosyyttien kasvatusliuosta testattu mediumtestien yhteydessä. Syyt verisuonimuodostuksen heikkenemiseen yhteisviljelmässä sydänlihassolujen kanssa voivat olla angiogeneesimallille epäedullinen kasvatusliuos, kardiomyosyyttien angiogeneesimallille aikaansaama tuntematon vaikutus sekä angiogeenisten kasvutekijöiden puute.

Fluoresenssivärjäysten perusteella sydänlihassolujen morfologia vaihteli riippuen siitä, kasvoivatko sydänlihassolut angiogeneesimallin päällä vai yksisoluviljelmänä. Myös saman kuopan kardiomyosyyttien morfologia vaihteli sen mukaan, oliko solujen välittömässä läheisyydessä verisuonirakenteita. Fibronektiinipinnoitetun 48-kuoppalevyn angiogeneesimallin päällä kasvavat hESC-kardiomyosyytit muistuttivat morfologialtaan kypsää sydänlihassolua, kun taas pelkkiä sydänlihassoluja sisältävän fibronektiinipinnoitetun kontrollikuopan soluilla oli kulmikas, fetaalinen rakenne. Angiogeneesimallin solujen vaikutus kardiomyosyyttien morfologiaan havaittiin myös iPS-soluja käytettäessä sekä muilla pinnoitusmateriaaleilla ja formaateilla. Tämä tuki aikaisempia havaintoja siitä, että sydänkudoksessa olevien tärkeimpien solutyypin yhdistäminen soluviljelmässä on oleellista solujen normaalille toiminnalle ja vasteille (Vuorenpää ym. 2014, 284).

Tässä tutkimuksessa saatiin hyödyllistä lisätietoa pinnoitusmateriaalien ja happiplasma-käsittelyn vaikutuksista sydänmalliprojektin jatkotutkimuksia varten. Jatkossa olisi mielenkiintoista tutkia, millainen vaikutus sydänlihassolujen siirrostuspäivällä on muodostuviin rakenteisiin. Sydänlihassolujen siirrostuspäivällä on oletettavasti vaikutusta verisuonirakenteiden muodostumiseen, koska siirrostuksen yhteydessä angiogeneesimallin soluille optimoitu kasvatusliuos vaihdetaan sydänlihassoluille optimoituun kasvatusliuokseen. Tässä tutkimuksessa käytettyjen hESC- ja iPS-sydänlihassolujen lisäksi olisi mielenkiintoista kartoittaa muiden sydänlihassolulinjojen soveltuvuutta sydänmalliin.

LÄHTEET

Adair, T. H. & Montani, J-P. 2010. Angiogenesis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences 2010.

Beilmann, M., Birk, G. & Lenter, M. C. 2004. Human primary co-culture angiogenesis assay reveals additive stimulation and different angiogenic properties of VEGF and HGF. *Cytokine* 2004. 26 (4), 178–185.

Bergmann, O., Bhardwaj, R. D. Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S. & Frisén, J. 2009. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* 4/2009. 324(5923), 98–102.

Blau, A. 2013. Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array in vitro electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10/2013, 18(5), 481–492.

Borges, J., Mueller, M. C., Padron, N. T., Teq Temeier, F., Lang, E. M. & Stark, G.B. 2003. Engineered Adipose Tissue Supplied by Functional Microvessels. *Tissue Engineering* 2003. 9(6), 1263–1270.

Brown, K. J., Maynes, S. F., Bezos, A., Maguire, D. J., Ford, M. D. & Parish, C. R. 1996. A novel in vitro assay for human angiogenesis. *Nature Publishing Group* 1996, 539–555.

Brutsaert, D. L. 2003. Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity. *Physiological Reviews* 1/2003. 83(1), 59–115.

Cai, X., Lin, Y., Hauschka P. V. & Grottkau, B. E. 2011. Adipose Stem Cells Originate from Perivascular Cells. *Biology of the Cell/ Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 2011. 103 (9), 435–447.

Cellectis Bioresearch. Technical Manual. Maintenance of Frozen hES-CMC™ in single cell format.

Cellular Dynamics international. iCell® Cardiomyocytes User's Guide. Luettu 11.12.13 http://www.cellulardynamics.com/products/lit/CDI_iCellCMUsersGuide110927.pdf

Cooke, M. J., Phillips, S. R., Shah, D. S. H., Athey, D., Lakey, J. H. & Przyborski, S. A. 2008. Enhanced cell attachment using a novel cell culture surface presenting functional domains from extracellular matrix proteins. *Cytotechnology* 2/2008. 56(2), 71–79.

Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. 2005. Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science* 8/2005, 1369–1373.

Cross, M. J. & Claesson-Welsh, L. 2001. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* 4/2001. 22(4), 201–207.

de Villiers, J. A., Houreld, N. & Abrahamse, H. 2009. Adipose Derived Stem Cells and Smooth Muscle Cells: Implications for Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports* 9/2009. 5(3), 256–265.

Diener electronic GmbH + Co. KG. 2009. Pico example version G [kuva]. Tallennettu 02.05.14. <http://www.plasma.de/en/plasmasystems/pico.html#>

Dominici, M., Le Blanck, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J & Horwitz, E. 2006. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 2006. 8(4), 315–317.

Donovan, D., Brown, N. J., Bishop, E. T. & Lewis, C. E. 2001. Comparison of three in vitro human ‘angiogenesis’ assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis*. 6/2001. 4(2), 113–121.

Eales, L-J. 2003. *Immunology for Life Scientists*. 2. painos. Iso-Britannia: John Wiley & Sons.

Egert, U. & Meyer, T. 2005. Heart on a Chip – Extracellular Multielectrode Recordings from Cardiac Myocytes in Vitro. *Practical Methods in Cardiovascular Research* 2005, 432–453.

European Medicines Agency. 2005. The nonclinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. Luettu 22.04.2014. <http://www.emea.eu.int>

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2004/10/EY, Annettu 11.02.2004 hyvän laboratoriokäytännön periaatteiden noudattamista kemiallisten aineiden kokeissa ja periaatteiden noudattamisen todentamista koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä.

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU 4. Koe-eläinten käytön korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskeva periaate.

Grosberg, A., Alford, P. W., McCaina, M. L. & Parker, K. K. 2011. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: Heart on a chip. *Lab on a Chip* 11/2011, 4165–4173.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. & De Bruijn, E. A. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 12/2004, 549–580.

Hoff, P. M. & Machado, K. K. 2012. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treatment Reviews* 11/2012. 38(7), 825–833.

Huttala, O. 2012. Human Adipose Stromal Cell Angiogenesis Assay: Development of Stimulation Medium and Set-up of Cell Characterization. Tampereen yliopisto. Bioteknologian laitos. Pro gradu -tutkielma.

Ihmissolupohjaisten eläinkokeettomien testimenetelmien kehittäminen ja niistä tiedottaminen. 2014. Kolmivuotinen ohjelma FICAMILLE Vuosille 2014-2016: EU-direktiiviin ”Tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (2010/63/EU)” liittyvä maa- ja metsätalousministeriön ohjelma.

Koe-eläinten käyttö Suomessa: Vuosittaiset käyttömäärät 2007 – 2012. Lääninhallitus & Ella-eläinkoelautakunta 2014. Luettu 22.04.2014. <http://www.laanhallitus.fi/>

Kolios G. & Moodley Y. 2013. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration* 12/2013. 85(3), 3–10.

Kühn, K. 1995. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biology* 2/1995. 14(6), 439–445.

Lackie, J. 2010. Oxford University Press. A Dictionary of Biomedicine, 138.

Laki tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta. 01.08.2013/497.

Lewin, B., Cassimeris, L., Lingappa, V. R. & Plopper, G. 2007. Cells. Canada: Jones and Bartlett Publishers.

Life Technologies. 2014. Cell Culture Basics Handbook. Luettu 01.03.2014. <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A. & Krieger, M. 2003. Molecular Cell Biology. 5. painos. USA (NY): W. H. Freeman 2003.

Merfeld-Clauss, S., Gollahalli, N., March, K. L. & Traktuev, D. O. 2010. Adipose Tissue Progenitor Cells Directly Interact with Endothelial Cells to Induce Vascular Network Formation. *Tissue Engineering* 2010. Part A. 16(9), 2953–2966.

Multichannel Systems. 2014a. Kuusikaivoinen MEA [kuva]. Tallennettu 22.04.2014. http://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/styles/medium/public/images/product/6well_tcr.jpg

Multichannel Systems. 2014b. MEA2100 Desc System [kuva]. Tallennettu 23.04.2014. http://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/images/category/product/MEA2100_Desc_System.jpg

Multichannel Systems. 2014c. Microelectrode array (MEA) manual. Luettu 07.04.2014. http://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/manuals/MEA_Manual.pdf

Multichannel Systems. 2014d. Standardikokoinen MEA [kuva]. Tallennettu 19.05.2014. <http://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/images/product/8x8-Ti-iR-pr.jpg>

- Nag, A. C. 1979. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 1979. 28(109), 41–61.
- Newman, T. M. & Severs, N. J. 1996. Effect of neuromimetics upon the release of atrial natriuretic peptide granules: are multiple pathways involved in secretion. *Journal of Cellular Physiology* 6/1996, 134–140.
- Norrbby, K. 2007. In vivo models of angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 5/2007. 10(3), 588–612.
- Pfannkuche, K., Hannes, T., Khalil, M., Noghabi, M. S., Morshedi, A., Hescheler, J. & Dröge, P. 2010. Induced Pluripotent Stem Cells: A New Approach for Physiological Research. *Cell Physiol Biochem* 2010, 105–124.
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., Pell, C.L., Johnstone, B. H., Considine, R. V. & March, K. L. 2004. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*. 3/2004, 1292–1298.
- Reppel, M., Pillekamp, F., Brockmeier, K., Matzkies, M., Bekcioglu, A., Lipke, T., Nguemo, F., Bonnemeier, H. & Hescheler, J. 2005. The electrocardiogram of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Journal of Electrocardiology* 10/2005. 38(4), 166–170.
- Ross, M. H. & Pawlina, W. 2006. 5. painos. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sarkanen, J.-R., Mannerström, M., Vuorenpää, H., Uotila, J., Ylikomi, T. & Heinonen, T. 2010. Intra-Laboratory Pre-Validation of a Human Cell Based in vitro Angiogenesis Assay for Testing Angiogenesis Modulators. *Frontiers in Pharmacology* 1/2010, 1–13.
- Sarkanen, J.-R., Vuorenpää, H., Huttala, O., Mannerström, B., Kuokkanen, H., Miettinen, S., Heinonen, T. & Ylikomi, T. 2012. Adipose Stromal Cell Tubule Network Model Provides a Versatile Tool for Vascular Research and Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs* 5/2012, 385–397.
- Severs, N. 1996. The Cardiac Muscle Cells. *BioEssays*. Luettu 08.05.2014.
http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.104.b3/content/pdf/04_11_Cardiac_Myocytes_Severs.pdf
- Sitterley, G. 2008. Attachment and matrix factors. *Biofiles*. Sigma-Aldrich, 3/2008. Luettu 12.02.2014. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/flashapps/biofiles-movie/pdf/biofiles_issue3.8.pdf
- Sobzak, M., Dargatz, J. and Chrzanowska-Wodnicka, M. 2010. Isolation and Culture of Pulmonary Endothelial Cells from Neonatal Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 12/2010. 46, 1–4.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K. & Hedrick, M. H. 2005. Multipotential Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *The Keio Journal of Medicine* 2005. 54(3), 132–141.

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. & Tada, T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology* 10/2001. 11(19), 1553–1558.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 5/2007, 861–872.

Vuorenpää, H., Ikonen, L., Kujala, K., Huttala, O., Sarkanen, J.-R., Ylikomi, T., Aalto-Setälä, K. & Heinonen, T. 2014. Novel in vitro cardiovascular constructs composed of vascular-like networks and cardiomyocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 4/2014. 50(4), 275–286.

Wan, Y., Qu, X., Lu, J., Zhu, C., Wan, L., Yang, J., Bei, J. & Wang, S. 2004. Characterization of surface property of polylactide-co-glycolide after oxygen plasma treatment. *Biomaterials* 8/2004. 25(19), 4777–4783.

Wagner, G. S. 2001. *Marriott's Practical Electrocardiography*. 10. painos. Yhdysvallat: Lippincot Williams & Wilkins.

Wikimedia Commons. 2007a. Antibody [kuva]. Tallennettu 23.04.14.
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibody.svg>

Wikimedia Commons. 2007b. SinusRhythmLabels [kuva]. Tallennettu 21.04.14
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SinusRhythmLabels.svg>

Wikimedia Commons. 2013a. Capillary [kuva]. Tekijä: Kelvinsong. Tallennettu 25.04.14. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Capillary.svg>

Wikimedia Commons. 2013b. Heartwall [kuva]. Tekijä: Blaus, B. Tallennettu 05.05.2014. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0470_HeartWall.png

Young, S., Wong, M., Tabata, Y. & Mikos, A. G. 2005. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Control Release* 12/2005. 109 (2005), 256–274.

Zhou, Z., Wang, J., Cao, R., Morita, H., Soininen, R., Chan, K. M., Liu, B., Cao, Y. & Tryggvason, K. 2004. Impaired Angiogenesis, Delayed Wound Healing and Retarded Tumor Growth in Perlecan Heparan Sulfate-Deficient Mice. *Cancer Research* 2004. 64(14), 4699–4702.

LIITTEET

Liite 1. Mediumien valmistusohjeet

1(2)

hASC-solujen kasvatusliuos	
100 ml:aan kasvatusliuosta	Komponentti
89 ml	DMEM/F-2
10 ml	HS, human serum
1 ml	GlutaMAX/L-glutamiini

HUVEC-solujen kasvatusliuos	
100 ml:aan kasvatusliuosta	Komponentti
100 ml	EBM-2
2 ml	FBS
40 µl	HY
400 µl	FGF
100 µl	VEGF
100 µl	IGF
100 µl	AA
100 µl	EGF
100 µl	HE

hESC-kardiomyosyyttien sulatusmedium		
100 ml:aan kasvatusliuosta	Komponentti	Valmistaja
20 ml	FBS	Gibco
1 ml	PEST (penicillin-streptomycin)	Gibco
1 ml	NEAA (non essential amino acids solution)	Gibco
200 µl	2-ME (2-merkaptetanoli)	Gibco
77,8 ml	DMEM	ATCC

2(2)

hESC-solujen kasvatusliuos	
150 ml:aan kasvatusliuosta	Komponentti
131,7 ml	DMEM
15 ml	FBS
1,5 ml	PEST
1,5 ml	NEAA
300 µl	2-ME

Liite 2. Immunovärjäysliuosten valmistusohjeet

40 ml:aan 4 % PFA:ta	Komponentti
10 ml	16 % PFA -ampulli rikotaan vetokaapissa
30 ml	1x PBS
Jako sopiviin eriin. Säilytys – 20 °C:ssa.	

250 ml 10 % BSA-liuosta	Komponentti
25,0 g	BSA-jauhetta
Liuotus 250 ml:aan 1xPBS:ää magneettisekoittajan avulla. Säilytys – 20 °C:ssa.	